

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

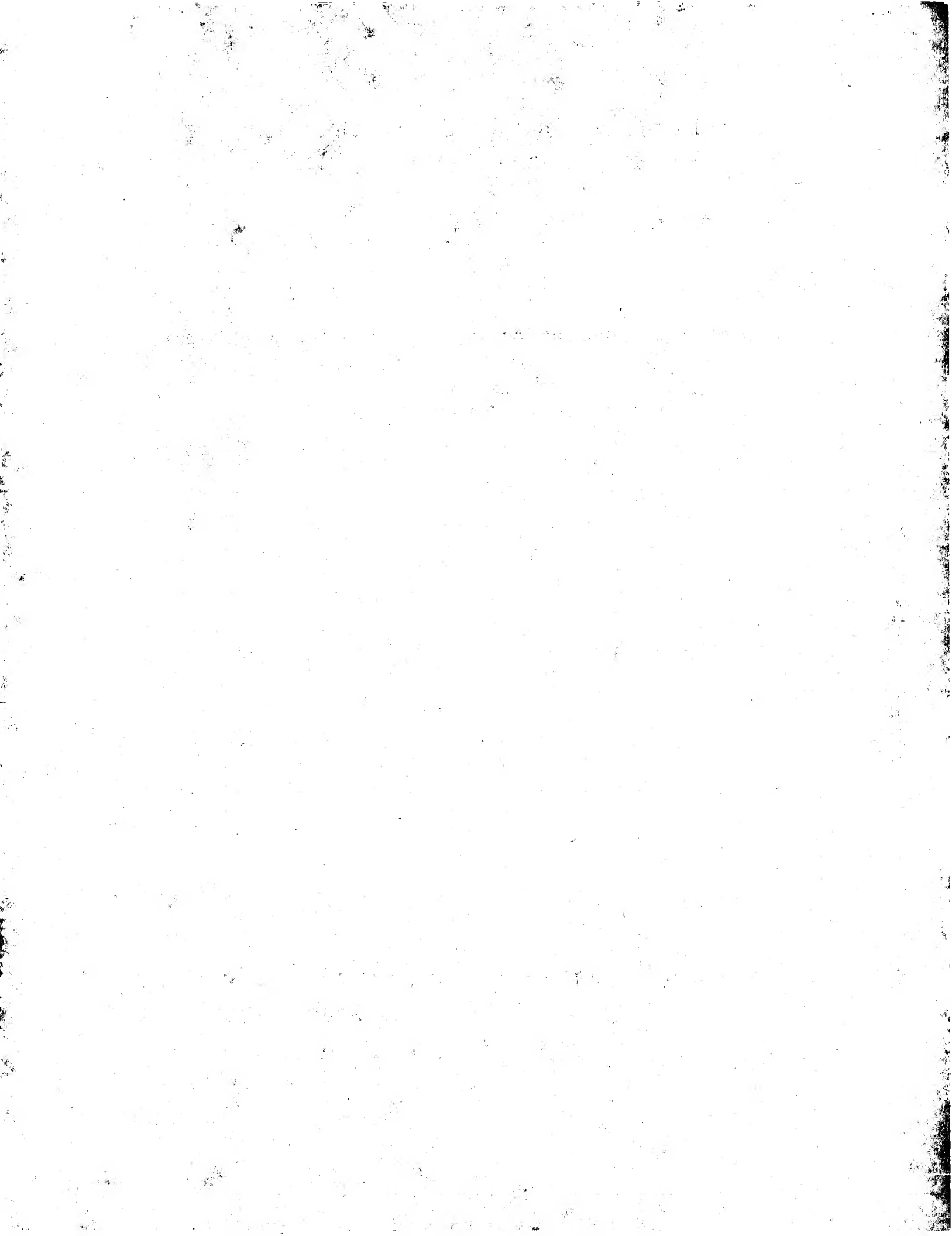
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**





3

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b> <b>C12N 15/62, A61K 39/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 91/13155</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 5. September 1991 (05.09.91)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP91/00308 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 19. Februar 1991 (19.02.91) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 40 05 874.3 24. Februar 1990 (24.02.90) DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :</b> LUBITZ, Werner [AT/DE]; Fürstenstr. 17, D-8000 München 2 (DE). SZOSTAK, Michael, P. [DE/DE]; Karl-Theodor-Str. 31, D-8000 München 40 (DE). <b>(74) Anwälte:</b> FOUQUET, Herbert usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), SU, US.  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>

**(54) Title:** CARRIER-BOUND RECOMBINANT PROTEIN, PROCESS FOR PRODUCING IT AND ITS USE AS AN IMMUNOGEN AND VACCINE

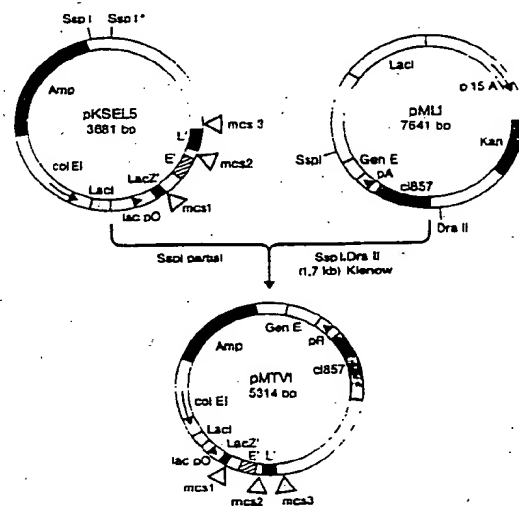
**(54) Bezeichnung:** TRÄGERGEBUNDENE REKOMBINANTE PROTEINE, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND VERWENDUNG ALS IMMUNOGENE UND VAKZINE

**(57) Abstract**

A carrier-bound recombinant protein is obtained by expression of a fusion protein gene in Gram negative bacteria that codes for at least a hydrophobic, non-lytic membrane integrating protein domain and for the recombinant protein, and by expressing a gene that codes for a lytic membrane protein from bacteriophages or for a lytic toxin release gene or lytic partial sequence thereof, the carrier-bound recombinant protein being recovered from the culture medium. The recombinant protein is fixedly incorporated in the cell wall complex of Gram negative bacteria by means of a target sequence. Also disclosed are a recombinant DNA used to produce the protein, the process for producing the same and the use of the disclosed carrier-bound recombinant protein for immunisation and as a vaccine.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein trägergebundenes, rekombinantes Protein, erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein kodiert und eines Gens das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder für ein lytisch wirkendes Toxinreleasogen oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon kodiert und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe. Das rekombinante Protein wird dabei über eine Targetsequenz fest in den Zellwandkomplex von gramnegativen Bakterien eingebaut. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA zur Herstellung des Proteins, das Herstellungsverfahren sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine zur Immunisierung und als Vakzine.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Trägergebundene rekombinante Proteine, Verfahren zur  
Herstellung und Verwendung als Immunogene und Vakzine

Die Erfindung betrifft trägergebundene rekombinante Proteine, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere als Immunogene und Vakzine.

Die Hauptaufgabe des Immunsystems bei Mensch und Tier besteht in der Abwehr und Vermeidung pathologischer Schäden, die aufgrund von entarteten Zellen infektiösen Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen entstehen. Das Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, daß eine immer stärker werdende Resistenz nach wiederholten Infekten mit Krankheitserregern auftritt. Ziel der Immunisierung ist es, Abwehrkräfte des Immunsystems gegen bestimmte Krankheitserreger aufzubauen, ohne entsprechende Krankheiten auszulösen.

Antikörper und zelluläre T- und B-Lymphozyten, sorgen für die spezifische Abwehr von Erregern. Dabei ist die Erkennung fremder Strukturen wie z. B. solcher, die auf einer Bakterienzelle vorkommen, eine wesentliche Voraussetzung. Je nach Stimulierung des Immunsystems kann dabei nach Immunisierung eine zeitlich begrenzte oder eine lebenslange Immunität gegen Krankheitserreger aufgebaut werden.

Für die Qualität von monoklonalen und polyklonalen Antikörpern sowie für die Wirksamkeit von Vakzinen ist es wesentlich, daß die Immunantwort auf das Antigen in ausreichendem Umfang erfolgt. Häufig zeigen jedoch virale Antigene oder rekombinante humane Proteine, wenn sie ohne weitere Modifikation eingesetzt werden, eine schlechte oder gar keine Immunantwort. Aus diesem Grund werden diese Antigene häufig an Träger (vorzugsweise an Proteine) gekoppelt um die Immunantwort zu verstärken. Durch die Bindung der Antigene an den Träger können jedoch die Antigene im oder in der Nähe der antigenen Determinante verändert werden. Dadurch kann die Immunantwort beträchtlich geschwächt werden.

Zur Verbesserung der Immunantwort ist es vorteilhaft, solche Antigene in die äußere Membran von Bakterien einzubauen und diese Komplexe als Immunogene zu verwenden (J. Immunol. 139 (1987) 1658 - 1664, Bacterial Vaccines and Local Immunity - Ann. Sclavor 1986, n.1-2, pp. 19-22, Proceedings of Sclavo International Conference, Siena, Italy, 17-19 November 1986). Auch werden abgeschwächte bzw. abgetötete Erreger (Bakterien oder Viren), aufbereitete Teilkomponenten von Krankheitserregern (Membranproteine von Bakterien, Strukturproteine von Viren) oder rekombinante Lebendvakzine (Viren oder Bakterien) eingesetzt.

Ein Nachteil bei der Verwendung von lebenden Bakterien oder Viren als Immunogene für die Immunisierung liegt darin, daß eine unerwünschte krankheitserregende Ausbreitung der Keime nicht ausgeschlossen werden kann.

Durch Abtötung oder Fragmentierung der Bakterien und Viren vor Verwendung als Immunogen oder Vakzine kann allerdings die antigene Determinante verändert

werden, wodurch die Immunantwort deutlich geringer sein kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, Immunogene und Vakzine bereitzustellen, die diese Nachteile nicht besitzen.

Diese Aufgabe wird durch ein trägergebundenes, rekombinantes Protein gelöst, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinrelease Gen oder für lytische Teilsequenzen davon (im folgenden als Lyse-Gen bezeichnet) kodiert und Gewinnung des trägergebundenen, rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.

Vorzugsweise wird die Expression des Fusionsprotein-Gens und des Lyse-Gens von zwei verschiedenen Promotoren (Fig.1) aus gesteuert. Die Expression des Lyse-Gens erfolgt vorzugsweise verzögert gegenüber der Expression des Fusionsproteins.

Durch diese Art der Expression von Fusionsprotein-Gen und Lyse-Gen wird erreicht, daß zunächst eine Vielzahl von Fusionsproteinen in die Membran der als Wirtsorganismus verwendeten gramnegativen Bakterien integriert werden und anschließend eine Lyse dieser Bakterien erfolgt. Der sonst dichte Zellwandkomplex der Bakterien wird dabei so permeabilisiert, daß die cytoplasmatischen Bestandteile der Bakterien freigesetzt werden. (Eur. J. Biochem. 180 (1989), 393 - 398). Die Morphologie der Zellen, beispielsweise die Stäbchenform

von E.coli Zellen, bleibt erhalten. Es bildet sich lediglich in einem abgegrenzten Bereich der Membran eine Tunnelstruktur aus. Die Tunnelbildung wird begleitet durch eine Fusion der inneren und äußeren Membran am Tunnelrand. Die auf diese Weise entstandenen Bakterienhüllen stellen die Träger für das rekombinante Protein dar und werden im weiteren als Bakterienghosts bezeichnet (Fig. 2).

Die Bakterienghosts bestehen aus cytoplasmatischer (innerer) Membran, periplasmatischem Raum und äußerer Membran, wobei die Integrität des Zellwandkomplexes weitgehend erhalten bleibt. Für Bakterienstämme, die zusätzlich eine S-Layer-Schicht (parakristalline Proteinschicht außerhalb der äußeren Membran) aufweisen, ist diese Proteinschicht ebenfalls Bestandteil der Bakterienghosts (Ann. Rev. Microbiol. 37 (1983), 311-339). Die Bakterienghosts sind somit Träger der rekombinanten Proteine (Immunogene) und stellen gleichzeitig aufgrund ihres Aufbaus (Peptidoglykan, Lipopolysaccharid) das Adjuvans zur Verstärkung der Immunantwort dar.

Als Wirtsorganismen sind alle gramnegativen Bakterien, vorzugsweise gramnegative Krankheitserreger wie z.B. *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter jejuni*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* geeignet (Schaechter, M, H. Medoff, D. Schlesinger, Mechanisms of Microbial Disease. Williams and Wilkins, Baltimore (1989) ).

Die erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine eignen sich überraschend gut als Immunogene,



wobei es zu ausgeprägten Immunantworten und sehr hohen Antikörper-Titern kommt.

Ein besonderer Vorteil ergibt sich dadurch, daß das rekombinante Protein direkt nach der Expression in die Membran der Bakterien integriert und so die Trägerbindung hergestellt wird. Damit erübrigt sich die Isolierung des rekombinanten Proteins als solches vor Herstellung des Immunogens. Da es zudem für die Herstellung von immunogenhaltigen Bakterienghosts ausreichend ist, wenn einige hundert bis zur maximal möglichen Anzahl (ca. 50000) rekombinante Antigene in die Membran der Bakterienghosts integriert sind, erübrigt sich eine Überexpression des rekombinanten Proteins.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß sehr viele antigene Epitope im Zellwandkomplex der Bakterienghosts präsentiert werden. Es hat sich gezeigt, daß die Targetsequenzen für die rekombinanten Proteine bestimmte Bereiche innerhalb des Bakterienzellwandkomplexes zur Integration bevorzugen. Diese Bereiche stellen hauptsächlich Adhäsionsstellen der inneren und äußeren Membran dar und stehen mit der Zellteilung der Bakterien in Verbindung. Dadurch kommt es zu keiner uniformen Verteilung des rekombinanten Proteins sondern zu inselartigen Anreicherungen innerhalb des Zellwandkomplexes (vgl. Fig. 2d). Die gehäufte Anordnung der rekombinanten Proteine innerhalb eines relativ kleinen Bereichs (cluster) hat den Vorteil, daß Immunglobulin-tragende B-Zellen zur Poliferation angeregt werden. Zum anderen wirkt das in den Bakterienhüllen vorhandene Lipopolysaccharid als Mitogen und löst ebenfalls ein Signal zur Zellteilung aus. Damit erhält man eine effektive Stimulation der B-Zell-spezifischen Produktion von Immunglobulinen.

Weiter hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine in ihren natürlichen Proteinstrukturen und damit in aktiver Form in die Bakterienmembran integriert sind.

Dies ist besonders überraschend, da üblicherweise rekombinante Proteine nach Expression in Prokaryonten als inclusion bodies (vgl. EP-A 0219 874, WO 89/03711) in inaktiver Form erhalten werden und erst anschließend durch Denaturierung und Renaturierung in die aktive Form übergeführt werden können.

Als rekombinante Proteine geeignet sind alle dem Fachmann geläufigen Proteine. Besonders bevorzugt werden Humanproteine und Antigene, insbesondere virale Antigene verwendet. Ihre Größe ist nicht begrenzt. Vorzugsweise beträgt das Molekulargewicht der Antigene aber 2000 bis 200000 Dalton.

Besonders bevorzugt weist das rekombinante Antigen antigene Strukturen von humanen Viren und Retroviren wie z.B. von HIV, HBV und EBV auf.

Die hydrophoben, nicht lytisch wirkenden und membranintegrierenden Proteindomänen werden im weiteren als Targetsequenzen bezeichnet. Bevorzugt sind als Targetsequenzen komplette Sequenzen oder Teilsequenzen von Membranproteinen, die jedoch auch durch Aminosäureaustausche modifiziert sein können. Ein solcher Austausch darf jedoch die Struktur des entsprechenden Proteins nicht verändern.

Vorzugsweise werden solche Targetsequenzen verwendet, die - im Unterschied zu Signalsequenzen von anderen Membranproteinen- durch in der Membran vorkommende Proteasen (z. B. Signalpeptidase und Proteasen des periplasmatischen Raums) nicht gespalten werden. Targetsequenzen können beispielsweise durch Proteinengineering aus natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der PhiX174 Phagengruppe (für N-terminales Targeting) sowie aus den natürlich vorkommenden Sequenzen des Lysisgens der MS2 Phagengruppe (für C-terminales Targeting) abgeleitet werden.

Als Targetsequenz eignet sich vorzugsweise eine hydrophobe alpha-helicale Proteindomäne aus 14 bis 20 Aminosäuren, die N- und C- terminal von jeweils 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann. Vorzugsweise kann an diese Proteindomäne mindestens eine weitere Proteindomäne gebunden sein. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über flexible Linkersequenzen. Unter flexiblen Linkersequenzen sind hydrophile Aminosäuresequenzen mit 2 bis 100 Aminosäuren, vorzugsweise mit 2 bis 30 Aminosäuren, und mit ungeordneter Sekundärstruktur zu verstehen (Turn- und Random Coil-Sequenzen).

Die weiteren Proteindomänen, die an die erste Proteindomäne gekoppelt sind, können analog wie die erste Proteindomäne aufgebaut sein. Es ist jedoch bevorzugt, daß mindestens eine der weiteren Domänen eine  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzt und aus 10 bis 16 Aminosäuren, vorzugsweise 11 bis 13 Aminosäuren, aufgebaut ist. Solche  $\beta$ -Faltblattstrukturen gleichen vorzugsweise in ihrem Aufbau und ihrer Sekundärstruktur ampipathischen Proteinsequenzen, die in Porinen der

äußeren Membranen vorkommen. Für ein N-terminales Targeting ist es bevorzugt, solche Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 1 bis 54 von Protein E aus dem Phagen PhiX174 enthalten (im weiteren als E'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. Für ein C-terminales Targeting ist es bevorzugt, Targetsequenzen zu verwenden, welche die Aminosäuren 21 bis 75 von Protein L aus dem Phagen MS2 enthalten (im weiteren als L'-Sequenz bezeichnet) und nicht lytisch wirken. (Sequenzen vergleiche EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Sequenzen, die sich aus den genannten Sequenzen der E- und L-Targetsequenzen durch einen homologen Aminosäureaustausch, der keine Veränderung der Proteinsekundärstruktur verursacht, ableiten.

Unter Membranproteinen von Bacteriophagen sind vorzugsweise Membranproteine von Bacteriophagen der Klasse Mikroviridae, vorzugsweise von icosahedralen, lytischen und ssDNA enthaltenden Phagen, die Enterobacteriaceae infizieren können, zu verstehen. Beispiele hierfür sind die Phagen PhiX174, S13, G4, G6, G14, PhiA, PhiB, PhiC, PhiR, welche E. coli C Stämme infizieren können. Ebenso geeignet ist alpha3, welcher E. coli C und E. coli B Stämme infizieren kann. Ebenso geeignet sind die Phagen K9, St-1, PhiK, PhiXtB und U3, welche E. coli K12 Stämme infizieren können (Sinsheimer R.L. (1968) in: Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. (Davidson J.N. & Cohn W.W., eds) Vol.8, Academic Press, New York & London, pp. 115-169; Tessman E.S. & Tessmann I. (1978) in: The single-stranded DNA Phages (Denhardt D.T., Dressler D. & Ray D.S., eds.) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, pp. 9-29; Hayashi M., Aoyama A., Richardson D.L. & Hayashi M.N. (1987) in: The Bacteriophages, pp. 1-71).

Als lytisch wirksame Membranproteine sind vorzugsweise Lyseproteine aus den genannten Bakteriophagen sowie andere Toxin-release Gene wie Colicin Lysegen (Microbiol. Sciences 1 (1984) 168-175 und 203 -205) geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an den gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden. Beispiele für Bindungspaare, deren Partner als Bindungspartner geeignet sind, sind beispielsweise Biotin - Streptavidin bzw. Avidin, Hapten - Antikörper, Antigen - Antikörper, Konkavalin - Antikörper, Zucker - Lectin, Hapten - Bindeprotein (z.B. Thyroxin bindendes Globulin und Thyroxin) oder Oligopeptid-Antikörper.

Bevorzugt wird als bindendes Paar Streptavidin bzw. Avidin und Biotin eingesetzt. Besonders bevorzugt wird als immobilisiertes, rekombinantes Protein Streptavidin bzw. Avidin verwendet und daran biotinyliertes Antigen gebunden.

Weiter ist es bevorzugt als rekombinantes Protein ein Protein zu verwenden, das einen chemischen Liganden erkennt. Beispiele hierfür sind  $\beta$ -Galactosidase/p-Aminophenyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (ein Strukturanalages der Lactose), Gene 29 (1984) 27-31. Durch die Erkennung des aktiven Zentrums der  $\beta$ -Galactosidase ohne eine Spaltung des Substrats, werden derartig substituierte Produkte an die Bakterienghost gebunden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lysegensequenz), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bacteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

Als DNA-Targetsequenzen werden DNA-Sequenzen bevorzugt, welche für das L'- Protein oder E'- Protein kodieren. Ebenso geeignet sind DNA-Sequenzen, die für von diesen Proteinen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit gleicher Sekundärstruktur kodieren. Diese Sequenzen sind vorzugsweise durch DNA-Sequenzen verbunden, die für hydrophile Proteindomänen mit 2 bis 30 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur codieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die DNA-Lysegensequenz die DNA-Sequenz des E-Proteins, die DNA-Sequenz des L-Proteins oder die DNA-Sequenz des EL-Hybridproteins (Sequenzen vgl. EP-A 0 291 021). Ebenso geeignet sind Teilsequenzen davon, die lytisch wirken.

Die DNA-Proteinsequenz ist vorzugsweise die DNA-Sequenz eines viralen Antigens (z. B. HIV, HBV, EBV) oder eines rekombinanten Humanproteins.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen, rekombinanten Proteins, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende, membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und das trägergebundene, rekombinante Protein aus der Kulturbrühe gewonnen wird. Die Transformation und Expression kann nach den dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Transformation durch Elektroporation oder Konjugation.

Vorzugsweise wird während der Fermentation zunächst die Aktivität des lytischen Proteins inhibiert oder die Expression des Lysegens reprimiert und erst zu einem gewünschten Zeitpunkt, vorzugsweise in der späten logarithmischen Phase, die Inhibierung oder Repression aufgehoben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird das so gewonnene trägergebundene, rekombinante Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für das Protein inkubiert und das entstandene Konjugat isoliert. Als Bindungspartner sind die oben genannten Partner der Bindungspaare geeignet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die Gene von mindestens zwei verschiedenen rekombinanten Proteinen erfindungsgemäß exprimiert. Dadurch können Immunogene oder Vakzine erhalten werden, die mehrere antigene Strukturen aufweisen. Besonders bevorzugt ist es hierbei, als rekombinante Proteine die antigenen

Determinanten von verschiedenen Viren oder Retroviren (z.B. HIV1, HIV2, HBV und EBV) zu verwenden. Zur Expression können diese Gene in einem Expressionsvektor entweder als offener Leserahmen in 3'-Richtung nach dem Gen der Targetsequenz angeordnet sein oder es kann für jedes zu exprimierende rekombinante Protein ein eigener Vektor verwendet werden. In diesem Fall ist es jedoch erforderlich, daß die Vektoren mit jeweils anderen origins of replication und anderen Resistenzgenen versehen sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Antikörpern, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen, rekombinanten Protein, welches erhältlich ist durch Expression eines Fusionsprotein in gramnegativen Bakterien und welches mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membran-integrierende Proteindomäne sowie das rekombinante Protein enthält, gegebenenfalls dazu verzögerter Expression eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bacteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxin-release Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz nach bekannten Verfahren gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transformierenden Agenzien mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert, die Zelllinie, welche die gewünschten Antikörper produziert, kloniert und kultiviert und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die monoklonalen Antikörper gewonnen.



Es hat sich gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren besonders zur Herstellung von viralen Immunogenen, wie z.B. HIV-Immunogenen, HBV-Immunogenen, geeignet ist.

Ebenso hat sich überraschenderweise gezeigt, daß rekombinante Antigene, die bei der Expression in Prokaryonten üblicherweise in inaktiver Form als refractile bodies anfallen (z.B. Humanproteine wie tPA oder G-CSF) bei der Expression nach dem erfindungsgemäßen Verfahren in ihrer Aktivität und damit in ihren antigenen Strukturen erhalten bleiben. Damit erweist sich das erfindungsgemäße Verfahren als besonders vorteilhaft bei der Herstellung immunogener rekombinanter Humanproteine.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen rekombinanten Proteine als Impfstoffe (Vakzine) und zur Stimulierung von T-Lymphozyten.

Die erfindungsgemäßen Impfstoffe können in üblicher Weise hergestellt und verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Impfstoffen unter Verwendung der erfindungsgemäßen trägergebundenen, rekombinanten Proteine. Die Herstellung dieser Impfstoffe kann nach den bekannten Methoden durchgeführt werden. Bevorzugt wird jedoch das trägergebundene, rekombinante Protein zunächst lyophilisiert und anschließend, ggf. unter Zusatz von Hilfsstoffen, suspendiert.

Es ist weiter bevorzugt, das Vakzin als multivalentes Vakzin zu formulieren. Hierzu kann das erfindungsgemäße trägergebundene rekombinante Protein mehrere an der

Membran des Bakterienghosts immobilisierte rekombinante Antigene enthalten.

Die Impfung mit dem erfindungsgemäßen Vakzin kann auf die jedem Fachmann geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise intradermal, intramuskular, intraperitoneal, intravenös, subkutan, oral und intranasal.

Zur intramuskulären oder subkutanen Gabe kann das Vakzin beispielsweise in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert sein. Zur intranasalen oder intraoccularen Applikation kann das Vakzin, beispielsweise in Form eines Sprays oder einer wäßrigen Lösung angewendet werden. Für lokale, beispielsweise orale Gabe ist es häufig erforderlich, die Immunogene zeitweise gegen Inaktivierung zu schützen, beispielsweise gegen saccharolytische Enzyme in der Mundhöhle oder gegen proteolytische Enzyme im Magen. Ein derartiger vorübergehender Schutz kann beispielsweise durch Verkapselung der Immunogene erfolgen. Diese Verkapselung kann beispielsweise durch Überziehen mit einem Schutzmittel (Mikroverkapselung) oder bei Einbettung einer Vielzahl von erfindungsgemäßen Immunogenen in einen schützenden Träger (Makroverkapselung) erfolgen.

Das Verkapselungsmaterial kann semipermeabel sein oder beim Einbringen in den menschlichen oder tierischen Körper semipermeabel werden. Üblicherweise wird für die Verkapselung eine biologisch abbaubare Substanz als Träger verwendet.

Die nachfolgenden Beispiele, Abbildungen und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.

Fig.1 zeigt schematische Darstellungen der Plasmide pkSELS, pML1 und pMTV1

Fig.2 Schematische Darstellung eines Bakterienghosts, als Träger rekombinanter Proteine

- a) Längsschnitt durch ein gramnegatives Bakterium (om: äußere Membran; pp: periplasmatischer Raum, im: innere (cytoplasmatische) Membran, cp: Cytoplasma).
- b) Ausbildung eines transmembranen Lysetunnels.
- c) Durch den Lysetunnel ausströmendes Cytoplasma.
- d) Bakterienghost mit Fusionsproteinen, die im Zellwandkomplex über Targetsequenzen verankert sind.

Beispiel 1**N-terminales Membrantargeting für HIV 1 gp41.**

Aus dem Plasmid pHF14 wird ein HIV 1 spezifisches DNA-Fragment durch einen partiellen HincII/PvuII Verdau als ein 1445bp DNA-Fragment isoliert. Das Fragment enthält die gesamte Sequenz von gp41, (345 Codons von gp41) Linker Sequenzen, die letzten 45 Codons von gp120. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1448 aus SEQ ID NO: 1.

Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 (SEQ ID NO:6) mit AccI und Auffüllen der überhängenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wird das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem linearisierten Plasmid ligiert. Das entstandene Plasmid wird mit pHIE1 bezeichnet und enthält in frame eine Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) von PhiX174 mit dem oben genannten HIV1-Fragment, wobei das natürliche Stoppcodon des HIV1 env-Gens erhalten bleibt.

Beispiel 2**N- sowie C- terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.**

Aus Plasmid pHF14 wird durch HincII-Verdau ein 1059 bp HIV1 spezifisches DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons aus gp120 sowie 301 Codons von gp41. Es entspricht den Nucleotiden 4 bis 1062 aus SEQ ID NO:1. Nach Linearisieren von Plasmid pKSEL5 mit AccI und nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden mit Klenow Polymerase wurde das HIV1 spezifische DNA-Fragment mit diesem Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE3

- 17 -

enthält eine in frame Fusion einer Teilsequenz des E-Gens (E'-Targetsequenz) mit einer HIV Teilsequenz und einer Teilsequenz des L-Gens ( L'-Targetsequenz).

### Beispiel 3

C-terminales Membrantargeting von HIV1 gp41.

Aus Plasmid pHF14 wird mit SalI und HincII ein 1061 bp DNA-Fragment isoliert. Dieses Fragment enthält 5'-seitig Linker Sequenzen gefolgt von 45 Codons gpl20 sowie 301 Codons gp41. Es entspricht den Nucleotiden 2 bis 1062 aus SEQ ID NO: 1. Nach Entfernen der E'-Sequenz aus dem Plasmid pKSEL5 durch XhoI/AccI-Verdau werden mit Hilfe von Klenow Polymerase die überstehenden DNA-Enden des Vektors und des isolierten HIV1 Fragment aufgefüllt und ligiert. Das entstandene Plasmid pHIE5 enthält eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des lacZ-Gens, Polylinker Codons, gpl20/gp41 Codons und Polylinker Codons gefolgt von der L'-Targetsequenz.

#### Beispiel 4

##### **C-terminales Membrantargeting von Streptavidin.**

Das 498 bp mit Klenow Polymerase aufgefüllte XbaI-Fragment (FXaStrpA, Nucleotid 2 bis 499 von SEQ ID NO:2) aus pFN6 wird in das Plasmid pKSEL5, aus welchem das E'-Gen-Fragment durch Schnitt mit HincII/XhoI deletiert wurde, in die aufgefüllten Schnittstellen ligiert. Das erhaltene Plasmid wird mit pAV5 bezeichnet. Damit ergibt sich im Plasmid pAV5 eine in frame Fusion der ersten 5 Codons des LacZ-Gens, 26 Aminosäurecodons aus der verbleibenden Polylinker Sequenz sowie der Aminosäuresequenzen des FXaStrpA-Anteils gefolgt von der L'-Targetsequenz.

#### Beispiel 5

##### **N-terminales Membrantargeting von Streptavidin.**

Aus Plasmid pFN6 wird nach BamHI-Verdau das 5'-seitig um eine Faktor Xa-Proteasen-Schnittstelle erweitertes Streptavidin-Gen als 511 bp Fragment isoliert. Es enthält Nucleotid 14 bis 524 aus SEQ ID NO:2. Dieses DNA-Fragment wird nach Auffüllen der Enden mit Klenow Polymerase in die aufgefüllte XbaI Schnittstelle des Vektors pKSEL5 zwischen die E' und L' Targetsequenzen integriert. In Plasmid pAV1 ist damit in frame eine Gen-Fusion aus der E'-Targetsequenz und der FXaStrpA-Sequenz erfolgt. Die 3'-seitig des Streptavidins vorkommenden Stoppcodons bleiben durch die vorgenommene Klonierung erhalten.

### Beispiel 6

#### N- und C- terminales Membrantargeting von Streptavidin.

Die in Plasmid pAV1 hinter dem Streptavidin-Gen vorkommenden Stoppcodons 5'-TAATAA-3' werden durch die Deletion eines 33bp großen DNA-Fragments, das durch partiellen HincII und nachfolgenden XbaI Verdau erzeugt wird, entfernt. Die Streptavidinspezifische DNA-Sequenz enthält Nucleotid 14 bis 499 aus SEQ ID NO:2. Nach Auffüllen der Plasmid-Enden mit Klenow Polymerase und Religation, fusioniert die auf dem Vektor enthaltene L'-Targetsequenz in frame an die E'-Targetsequenz und die FXaStrpA-Sequenz (Plasmid pAV3). Das entsprechende Genprodukt verfügt damit über eine N- sowie C-terminale Targetsequenz.

### Beispiel 7

#### N-terminales Membrantargeting von $\beta$ -Galactosidase.

Aus dem Plasmid pMC1403 (J. Bacteriol. 143 (1980) 971 - 980) wird mit Hilfe von PstI und DraI ein 3124 bp DNA-Fragment (SEQ ID NO:3) isoliert und gerichtet in die PstI und NruI Restriktionsstellen des Plasmids pKSEL5 ligiert. Das entstandene Plasmid pLZ1 enthält die ersten 54 Codons der E'-Targetsequenz, 13 Linker-Codons und 1015 Codons des LacZ Gens. Das für Plasmid pLZ1 verwendete PstI/DraI-Fragment erstreckt sich im Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 3 von Nucleotid 26 bis einschließlich 3149 und umfaßt 3124bp.

### Beispiel 8

#### N- und C- terminales Membrantargeting von $\beta$ -Galactosidase.

Aus Plasmid pMC1403 wird das 3010 bp LacZ DNA-Fragment (PstI - EcoRI, Nucleotide 26 bis 3035 aus SEQ ID NO: 3) isoliert und in die PstI/HindIII Restriktionsstelle von pKSEL5 nach Auffüllen der EcoRI bzw. HindIII Enden gerichtet integriert. Damit ergibt, sich in dem so erhaltenen Plasmid pLZ3 eine Fusion in frame der E'-Targetsequenz mit dem LacZ-Gen und der L'-Targetsequenz.

### Beispiel 9

#### C-terminales Membrantargeting von $\beta$ -Galactosidase.

Plasmid pLZ3 wird mit EcoRI und partiell mit AccI verdaut. Dadurch wird die E'-Targetsequenz entfernt. Das Fragment enthält die Nucleotide 29 - 3035 aus SEQ ID NO:3 und ist 3007 bp lang (nach Auffüllen der EcoRI-Schnittstelle). Nach Auffüllen der überstehenden DNA-Enden des Vektors und Religation ergibt sich der Vektor pLZ5 in welchem ein lacZ-L'-Fusionsgen vorliegt und dessen Genprodukt über C-terminale Membrantargetsequenz verfügt.



### Beispiel 10

Herstellung der trägergebundenen rekombinanten Proteine über die Plasmide pMTV1 (SEQ ID NO:4), pkSEL und pML1 (SEQ ID NO:5).

Auf den Plasmiden pMTV1 und pML1 befindet sich eine Lysekassette, bestehend aus dem Lambda cI857 Repressor-Gen, dem rechtsseitigen Lambdapromotor/Operator System pR sowie dem PhiX174 Lysegen E.

Die Integration des Fremdgens kann in der multiple cloning site mcs 2 für pMTV1 oder pkSEL5 (Fig.1) erfolgen. Dabei wird in analoger Weise wie in den Beispielen 1 - 9 beschrieben vorgegangen.

### Beispiel 11

#### Fermentation und Lyse

Das Plasmid wird in E. coli K12 (DSM 2093) integriert und die Kultur im Schüttelkolben bis zu OD 0,8 - 1,2 bei 600 nm angezogen, wobei die Expression des Lysegens E durch cI857 Repressormoleküle reprimiert ist (Eur. J. Biochem. 180 (1989) 393 bis 398). Durch Temperaturerhöhung auf 42°C während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien erfolgt die Expression von Gen-E durch thermische Inaktivierung der cI857 Repressormoleküle. Die durch Protein E verursachte Lyse von E. coli setzt je nach Kulturmedium (Voll- oder Minimalmedium, unter Belüftung im Schüttelwasserbad) der Bakterien zwischen 10 bis 30 min nach Temperaturerhöhung ein. Nach weiteren 10 bis 30 min ist die Lyse vollständig.

Beispiel 12**Modifizierte Protein E-Lyse.**

Es wird wie in Beispiel 11 kultiviert, wobei jedoch 30 min. vor Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C das Kulturmedium durch Zugabe von Magnesiumsulfatlösung auf 0,2 mol/l Magnesiumsulfat gebracht wird. Dies verhindert trotz Expression von Gen E die Lyse der Bakterien.

30 min. nach Temperaturerhöhung werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Durch Resuspension des Zellpellets in niedermolarem Puffer (PBS, 1 mmol/l Phosphatpuffer, 1 bis 10 mmol/l Tris - HCl pH 6 - 8) oder Wasser erfolgt eine sofortige Lyse der Zellen. Die dabei anfallenden Zellhüllen werden als Bakterienghosts bezeichnet. Bei diesen Bedingungen, die einer Kombination von Protein E-Lyse und osmotischem Schock entsprechen, wird eine größere Lysestruktur in den Bakterien erreicht. Die Morphologie der Bakterienghosts bleibt auch unter diesen Bedingungen weitgehend erhalten.

Zur Reinigung werden die Bakterienghost 2 x mit PBS oder 0,9 % NaCl gewaschen (resuspendieren und zentrifugieren) und gefriergetrocknet.

### Beispiel 13

#### Immunisierung

$10^9$  Keime (entsprechend 1 mg Bakterienghosts Trockengewicht) pro Maus werden in 0,9 % NaCl intraperitoneal 4 x in monatlichen Abständen zur Immunisierung gegeben. 8 Tage nach der letzten Immunisierung wird Serum gewonnen und die Antikörper werden isoliert.

### Beispiel 14

#### Bindung von biotinyliertem HBc-Antigen

Nach Beispiel 4 hergestellte Bakterienghosts, in die Streptavidin über Targetsequenzen integriert ist, werden lyophilisiert. 1 mg dieses Lyophilisats wird 10 ml einer Lösung von 20  $\mu$ g/ml eines Konjugats aus Hepatitis B core-Antigen und Biotin (hergestellt durch Reaktion von HBcAg mit N-Hydroxysuccinimid-aktiviertem Biotin) in 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, 30 min inkubiert und anschließend mehrfach mit 40 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Auf diese Weise wird ein trägergebundenes HBcAg-Immunogen erhalten, das zur Immunisierung und Gewinnung von Antikörpern verwendet werden kann.

Sequenzprotokolle

SEQ ID NO:1

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz HIV1(gp120/gp41)

SEQUENZLÄNGE:1451 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

```

gtgacactgc aggcattgcaa gctGATCTTC AGACCTGGAG GAGGAGATAT GAGGGACAAT    60
TGGAGAAGTG AATTATATAA ATATAAAGTA GTAAAAATTG AACCATTAGG AGTAGCACCC    120
ACCAAGGCAA AGAGAAGAGT GGTGCAGAGA GAAAAAGAG CAGTGGGAAT AGGAGCTTTG    180
TTCTTGGGT TCTTGGGAGC AGCAGGAAGC ACTATGGGCG CAGCGTCAAT GACGCTGAOG    240
GTACAGGCCA GACAATTATT GTCTGGTATA GTGCAGCAGC AGAACAATTT GCTGAGGGCT    300
ATTGAGGGCC AACAGCATCT GTTGCAACTC ACAGTCTGGG GCATCAAGCA GCTCCAGGCA    360
AGAATCCTGG CTGTGGAAAG ATACCTAAAG GATCAACAGC TCCTGGGGAT TTGGGGTTGC    420
TCITGGAAAC TCATTTCAC CACTGCTGTG CCTTGAATG CTAGTTGGAG TAATAAATCT    480
CTGGAACAGA TTTGGAATAA CATGACCTGG ATGGAGTGGG ACAGAGAAAT TAACAATTAC    540
ACAAGCTTAA TACACTCCIT AATTGAAGAA TCGCAAAACC AGCAAGAAAA GAATGAACAA    600
GAATTATTGG AATTAGATAA ATGGGCAAGT TTGTGGAATT GGTTTAACAT AACAAATTGG    660
CTGTGGTATA TAAAATTATT CATAATGATA GTAGGAGGCT TGGTAGGTTT AAGAATAGTT    720
TTTGCCTGAC TTTCTATAGT GAATAGAGTT AGGCAGGGAT ATTCACCAAT ATCGTTTCAG    780
ACCCACCTCC CAAACCCGAG GGGACCCGAC AGGCCGGAAG GAATAGAAGA AGAAGGTGGA    840
GAGAGAGACA GAGACAGATC CATTCGATTA GTGAACGGAT CCTTAGCACT TATCTGGGAC    900
GATCTGOGGA GCTGTGCTCT CTTGAGCTAC CACGCTTGA GAGACTTACT CTGATTTGA    960
ACGAGGATTG TGGAACCTCT GGAAGCAGG GGGTGGGAAG CCTCAAATA TTGGTGAAT    1020
CTCCTACAGT ATTGGAGTCA GGAAGTAAAG AATAGTGTCT TTAACCTGCT CAATGCCACA    1080
GCTATAGCAG TAGCTGAGGG GACAGATAGG GTTATAGAAT TAGTACAAGC AGCTTATAGA    1140
GCCATTCGCC ACATACCTAG AAGAATAAGA CAGGGCTTGG AAAGGATTTT GCTATAAGat    1200
gggtggcaag tggtaaaaa gtagtggtt tggatggcct gctgtaaggg aaagaatgag    1260
acgagctgag ccagcagcag atggggtggg agcagtatct cgagacctag aaaaacatgg    1320
agcaatcaca agtagcaata cagcagctac caatgcgat tgtgcttggc tagaagcaca    1380
agaggaggag gaggtgggtt ttccagtcac acctcaggta cctttaagac caatgactta    1440
caaggcagct g

```

In Großbuchstaben dargestellt ist der C-Terminus von gp160 von HIV1 (Originalkoordinaten des BH8-Klons: 7199 bis 8372 (nach Ratner et al. 1985)). Nach den 45 letzten Codons des C-Terminus von gp120 (5'-ATCTTCAGA .....GAAAAAGA-3') folgen die 345 Codons des gp41 (5'-GCAGTGGGAA.....TTTGTCTATAA-3'). 5'-seitig der HIV1-Sequenz erstreckt sich der für die folgenden Klonierungen verwendete Polylinker.

Referenz: Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starich, B., Josephs, S.F., Doran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, Jr. S.R., Pearson, M.L., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghrayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C., Wong-Staal, F. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature 313: 277 - 284.

SEQ ID NO:2

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (FXa-Strpa)

SEQUENZLÄNGE:525 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

DNA sequence FXa-StrpA 525 b.p. complete sequence ;

```
tctagaacta gtggatccat cgagggtagg tctATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT 60
CAGGTTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTGGACT 120
TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGAOGGAGCT CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCGGTGGT 180
AAGCAGAAT CCGCTACGT ACTGACTGGC CGTTATGACT CTGCACTGC CACGATGGC 240
TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCGCACAGC 300
GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATAOGTTGGC GGTGCTGAGG CTGATATCAA CACTCAGTGG 360
CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAAGOGAAT GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCATGAC 420
ACCTTTACCA AAGTTAAGC TTCTGCTGCT AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA 480
AACAAOGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTTCA CAATAAaag gatcc 525
```

In Großbuchstaben dargestellt ist die Streptavidinsequenz (Argarana et al. 1986). Die für die Faktor Xa-Spaltstelle Ile-Glu-Gly-Arg kodierende DNA-Sequenz 5'-atcagagggtagg-3' reicht in der hier aufgeführten Sequenz von Nukleotid 19 bis 30.

Referenz :

Argarana, C.E., Kuntz, I.D., Birken, S., Axel, R., Cantor, Ch.R. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. Nucl. Acids Res. 14 (4): 1871 - 1882.

SEQ ID NO:3

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (LacZ)

SEQUENZLÄNGE:3152 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

ATGACCATGA	TTACGAATTG	CTGCAGGTGG	AOGGATCCCG	TGGTTTTACA	ACGTGGTGAC	60
TGGGAAAACC	CTGGGTTTAC	CCAACCTAAT	CGCCTTTCAG	CACATCCCCC	TTTCGCCAGC	120
TGGGTAATA	GGAAGAGGC	CGCACCGAT	CGCCCTTCCC	AACAGTTGCG	CAGCCTGAAT	180
GGGAATGGC	GCTTTCCTTG	GTTCGGGCA	CCAGAAGGG	TGCGGAAAG	CTGGCTGGAG	240
TGCGATCTTC	CTGAGGCGA	TACTGTGCTC	GTCCCTTCAA	ACTGGCAGAT	GCAOGGTTAC	300
GATGCGCCCA	TCTACACCA	CGTAACCTAT	CCCATTAACG	TCAATCCGCC	GTTTGTTCCT	360
AOGGAGAATC	CGAOGGGTTG	TTACTGCTC	ACATTTAATG	TTGATGAAAG	CTGGCTACAG	420
GAAGGCCAGA	CGGAATTAT	TTTTGATGGC	GTAACTGG	CGTTTCATCT	GTGGTGCAAC	480
GGGCGCTGGG	TGGTTAOCG	CCAGGACAGT	CGTTTGCCT	CTGAATTTGA	CCTGAGGCGA	540
TTTTTAACGG	CGGAGAAAA	CGCCTTCGG	GTCATGGTGC	TGCGTTGGAG	TGAOGGCACT	600
TATCTGGAAG	ATCAGGATAT	GTGGCGGATG	AGCGGCATTT	TGCGTGACGT	CTCGTTGCTG	660
CATAAACCGA	CTACACAAAT	CAGGATTTT	CATGTTGCCA	CTCGCTTTAA	TGATGATTTT	720
AGCGCGCTG	TACTGGAGGC	TGAAGTTTCA	ATGTGCGGG	AGTTGCGTGA	CTACCTACGG	780
GTAACAGTTT	CTTTATGGCA	GGGTGAAAG	CAGGTGCGCA	GCGGCACCG	GCCTTTTCGG	840
GGTGAATTA	TGATGAGCG	TGGTGGTTAT	CGCGATCGG	TCACACTACG	TCGTGAACGT	900
GAAACCCGA	AACGTGTGG	CGCGAAATC	CGAATCTCT	ATCGTGGGT	GGTTGAACGT	960
CACACGCGG	ACGGCACGCT	GATTGAAGCA	GAAGCCTGG	ATGTGGTTT	CGCGAGGTG	1020
CGGATTGAAA	ATGGTCTGCT	GCTGCTGAAC	GGCAAGCGT	TGCTGATTCG	AGGCGTTAAC	1080
CGTCAOGAGC	ATCATCTCT	GCATGGTCAG	GTCTATGGAT	AGCAGACGAT	GGTGCAGGAT	1140
ATCTGTCTGA	TGAAGCAGAA	CAACTTTAAT	GGGTGGGCT	GTTGCGATTA	TGGAACCAT	1200
CGCTGTGGT	ACAOGCTGTG	CGACGCTAC	GGCCTGTATG	TGGTGGATGA	AGCCAATATT	1260
GAAACCCAG	GCATGGTGCC	AATGAATGTT	CTGACCGATG	ATCCGCGCTG	GCTACCGCGG	1320
ATGTAAGAAC	GGAATGAATC	AGGCCAOGCG	CGGATCGTA	ATCACCGAG	TGTGATCATC	1380
TGGTGGCTGG	ATCCTTCCCG	CGCGTGCGC	GCTAATCACG	ACGCGCTGTA	TGCTGGATC	1440
AAATCTGTGG	ATCCTTCCCG	CGCGTGCGC	TATGAAGCGG	GCGGAGCGG	CACCAOGGCC	1500
ACGATATTA	TTTGCCCGAT	GTACGCGCGC	GTGGATGAAG	ACCAGCCCTT	CCCGCTGTG	1560
CGAAATGGT	CCATCAAAAA	ATGGCTTTTG	CTACCTGGAG	AGACGCGCCC	GCTGATCCTT	1620
TGGAATAAG	CCACGCGAT	GGGTAACAGT	CTTGGCGGTT	TGCTAAATA	CTGGCAGGCG	1680
TTTTGTCAGT	ATCCCGGTTT	ACAGGGGCGC	TTGCTCTGGG	ACTGGGTGGA	TCAGTGGCTG	1740
ATTAAATATG	ATGAAAACGG	CAACCGCTGG	TGCGCTTACG	GCGGTGATTT	TGGGATACG	1800
CGAAGCATC	GCCAGTTCTG	TATGAACGGT	CTGGTCTTTG	CGACCGCAC	GCGCATCCA	1860
GCGCTGACGG	AAGCAAAACA	CCAGCAGCAG	TTTTTCCAGT	TGCTTTTATC	GGGCAAAACC	1920
ATCGAAGTGA	CCAGCGAATA	CCTGTTCCGT	CATAGCGATA	AOGAGCTCCT	GCACTGGATG	1980
GTTGGCGTGG	ATGGTAAGCC	GCTGGCAAGC	GGTGAAGTGC	CTCTGGATGT	CGCTCCACAA	2040
GGTAAACAGT	TGATTGAACCT	GCTGAACCTA	CGCAGCGCG	AGAGCGCGG	GCAACTCTGG	2100
CTCACAGTAC	GCGTAGTGCA	ACCGAAACGG	ACCGCATGGT	CAGAAGCGGG	GCACATCAGC	2160
GCGTGGCAGC	AGTGGGCTCT	GGGGAAAAC	CTCAGTGTGA	CGCTCCCGGC	CGGTCCCGAC	2220
GCCATCCCGC	ATCTGACCAC	CAGCGAAATG	GATTTTTTGA	TGAGCTGGG	TAATAAGCGT	2280
TGGCAATTTA	ACCGCCAGTC	AGGCTTTCTT	TCACAGATGT	GGATTGGCGA	TAAAAACAA	2340
CTGCTGACGC	CGCTGCGCGA	TCAGTTACCC	CGTGCACCGC	TGGATAAAGA	CATTGGGGTA	2400
AGTGAAGCGA	CCCGCATTTA	CCCTAACGCC	TGGGTGGAAC	GCTGGAAGGC	GGGGGGCAT	2460
TACCAGGCGG	AAGCAGCGTT	GTTCAGTGC	AOGGCAGATA	CACCTGCTGA	TGCGGTGCTG	2520
ATTACGACCG	CTACGCGGTG	GCAGCATCAG	GGGAAAACCT	TATTTATCAG	CGGAAAACCC	2580
TACCGGATTG	ATGGTAGTGG	TCAAATGGCG	ATTACGTTG	ATGTTGAAGT	GGGAGCGAT	2640
ACACCGCATC	CGCGCGGAT	TGGCTGAAC	TGCGAGCTGG	CGCAGGTAGC	AGAGCGGGTA	2700
AACTGGCTGG	GATTAGGGCC	GCAAGAAAAC	TATCCCGACC	GCCTTACTGC	CGCCTGTTTT	2760

ERSATZBLATT

```
GACCGCTGGG ATCTGCCATT GTCAGACATG TATACCCCGT ACGTCTTCCC GAGCGAAAAC 2820
GGTCIGCGCT GCGGGAOCOG CGAATTGAAT TATGGCCAC ACCAGTGGCG OGGGACTTC 2880
CAGTCAACA TCAGCOGCTA CAGTCAACAG CAACTGATGG AAACCAGCCA TOGCCATCTG 2940
CTGCAOCOGG AAGAAGGCAC ATGGCTGAAT ATCGACGGTT TOCATATGGG GATTGGTGGC 3000
GAOCTACTCT GGAGCCOGTC AGTATOGGCG GAATTOCAGC TGAGCGCOGG TOGCTACCAT 3060
TACCAGTTGG TCIGGIGTCA AAAATAataa taacogggca ggccatgtct gccogtattt 3120
ogcgtaagga aatccattat gtactattta aa 3152
```

In Großbuchstaben ist die DNA-Sequenz für das LacZ-Gen aus Plasmid pMC 1403 dargestellt.

Referenz : Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, M.S. 1980. In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. J. Bacteriol. 143: 971 - 980.

SEQ ID NO:4

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (pMTV1)

SEQUENZLÄNGE:5314 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

AAATGTGAAA	OGTTAATATT	AGACATAATT	TATCCTCAAG	TAAGGGGCGG	AAGCCCTGCG	60
AAATTAAATTT	GTGACCAACC	TACATACCAA	AGAAGAGGCG	CTTTAAGCTT	GCCTTTAGTA	120
CCTCCCAACG	GCTGGGGAAG	ACCAGGGGGA	GCGCCAGAAC	GTTTTTTTACC	TTTAGACATT	180
ACATCACTCC	TTCCGCAAGT	AATTTTITGAC	GCAAGTTTTT	TTCTGGGTCA	GTAAGAAAGT	240
CAGTGTTC	TGCGGTACA	CGCAAGGTAA	ACGGGAACAA	TTTCAAGGCT	TTAACGGGAC	300
GCTGAGCGC	ATTAAATAATG	TTTTTCGTAA	ATTTCAGGCG	TTCCATGATG	AGACAGGCGG	360
TTTGAATGTT	GAAGGATGA	ACATAATAAG	CAATGAAGGC	AGCAATAAAC	TCAACAGGAG	420
CAGGAAAGCG	AGGGTATCCC	ACAAAGTCCA	GCGTACCATA	AAAGCAAGCC	TCAACGCAGC	480
GACGAGCAAG	AGAGCGGTCA	GTAGCAATCC	AAACTTTTGT	ACTGGTCAGA	AAATCGAAAT	540
CATCTTGGGT	TAAATCCAAA	ACGGCAGAAG	CCTGAATTC	AGCTAGAGGA	TCCTTAGCTG	600
TCCTTGGTTTG	CCCAAAGGCG	ATTGCATAAT	CTTTTCAGGGT	TATGGGTTGT	TCCATACAAC	660
CTCCTTAGTA	CATGCAACCA	TTATCACCGC	CAGAGGTAAA	ATAGTCAACA	CGCAAGGTGT	720
TAGATATTTA	TCCCCTGGGG	TGATAGATTT	AACGTATGAG	CACAAAAAAG	AAACCATTAA	780
CACAAGAGCA	GCTTGAGGAC	GCAAGTGGCC	TTAAAGCAAT	TTATGAAAAA	AAGAAAAATG	840
AACTTGGCTT	ATCCAGGAA	TCGTGTCGAG	ACAAGATCGG	GATGGGGCAG	TCAGGCGTTG	900
GTGCTTTATT	TAATGGCATC	AATGCATTAA	ATGCTTATAA	CGCCGCATTG	CTTACAAAAA	960
TTCTCAAAGT	TAGGTTGAA	GAATTTAGCC	CTTCAATGCG	CAGAGAAATC	TACGAGATGT	1020
ATGAAGGCGT	TAGTATGCAG	CGTCACTTA	GAAGTGAATA	TGAGTACCC	GTTTTTTCTC	1080
ATGTTTCAGGC	AGGGATGTTT	TCACCTAAGC	TTAGAAACCT	TACCAAAGGT	GATGCGGAGA	1140
GATGGGTAAAG	CACAACCAAA	AAAGCCAGTG	ATHTCTGCAAT	CTGGCTTGAG	GTTGAAGGTA	1200
ATTCCATGAC	CGACCAACA	GGCTCCAAGC	CAAGCTTTCC	TGACGGAATG	TTAATTCTCG	1260
TTGACCCCTGA	GCAGGCTGTT	GAGCCAGGTG	ATTTCTGCAT	AGCCAGACTT	GGGGGTTGATG	1320
AGTTTACCTT	CAAGAAACTG	ATCAGGGATA	GCGGTACAGT	GTTTTTTACAA	CCACTAAACC	1380
CACAGTACCC	AATGATCCCA	TGCAATGAGA	GTTGTTCCGT	TGTGGGGAAA	GTTATGCTTA	1440
GTCAGTGGCC	TGAAGAGAGC	TTTGGCTGAT	CGGCAAGGTG	TTCTGGTGGG	CGCATAGCTG	1500
ATAACAATTG	AGCAAGAATC	TTTATGGAAT	TAGGGGAATT	TTCACTCCCC	TCAGAACATA	1560
ACATAGTAAA	TGGATTGAAT	TATGAAGAAT	GGTTTTTATG	CGACTTACCG	CAGCAAAAAT	1620
AAAGGGAAAG	ATACCTTGAAG	ACGAAAGGGC	ATTTTGTATA	AAATGCGGTT	AAATTTTGTG	1680
TAAATCAGCT	CATTTTTTTAA	CCAATAGGCC	GAAATCGGCA	AAATCCCTTA	TAAATCAAAA	1740
GAATAGACCG	AGATAGGGTT	GAGTGTGTGT	CCAGTTTGGG	ACAAGAGTCC	ACTATTAAAG	1800
AAAGTGGACT	CCAAGCTCAA	AGGGGGAATA	ACCGTCTATC	AGGGGAGTGG	CCCACTAAGT	1860
GAACCATCAC	CCTAATCAAG	TTTTTTTGGG	TGAGGTGCC	GTAAAGCACT	AAATGGAAGT	1920
CCTAAAGGGA	GCCCCCGATT	TAGAGCTTGA	CGGGGAAAGC	CGGCGAAAGT	GGCGAGAAAG	1980
GAAGGGAAGA	AAGCGAAAGG	AGCGGGGCGT	AGGGGCGTGG	CAAGTGTAGC	GGTACGCTG	2040
CGGTAACCA	CCACACCGCG	CGCGCTTAAT	GCGCGCTTAC	AGGGGCGGTC	CCATTGCGCA	2100
TTTCAAGGCTAC	GCAACTGTG	GGAAGGGGGA	TGGTGGGG	CCCTCTTGGT	ATTACGCGAG	2160
CTGGGGAAGG	GGGATGTGC	TGCAAGGGGA	TTAAGTTGGG	TAACGCCAGG	GTTTTCCCAG	2220
TCACGACGTT	GTAAAAACGAC	GGCCAGTGAA	TTGTAATAAG	ACTCACTATA	GGGCGAATTG	2280
GAGCTCCACC	GCGGTGGCGG	CGCTCTAGT	ATGGTGCAT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	2340
TGCGGCATAG	TTAAGCCAGT	ATATACACTC	CGCTATGCGT	ACGTGACTGG	GTCATGGCTG	2400
CGCCCGACA	CCCGCCAACA	CCCGCTGAGC	CGCCCTGAGC	GGCTTGTCTG	CTCCCGGCAT	2460
CGCTTACAG	ACAAGCTGTG	ACCGTCTCGG	GGAGCTGCAT	GTGTGAGAGG	TTTTTACCGT	2520
CATCACCGAA	ACGGCGAGG	CAGTAAGGTC	GGATGCTTTG	TGAGCAATTG	GTCCCTTAAG	2580
TAAGCAATTG	CTGTAAAGTC	GTCACGTGTC	GGATCAAGCG	TTCCAGTAGC	GACAGAAGCA	2640
ATTGATTGGT	AAATTTGAG	AGAAAGATCG	CGAGGAAGAT	CAATACATAA	AGAGTTGAAC	2700
TTCTTTGTTG	TCTTGCACAT	GGGTAACTCT	CATGTTTGAA	TGGCCCTAGA	GGATCGGCGC	2760
AAGCTTGCAT	GCCTCAGGT	CGACTCTAGA	GGATCCCGGA	CGCTGACGCG	CATTAATAAT	2820
GTTTTTCGTA	AATTCAGGCG	CTTCCATGAT	GAGACAGGCC	GTTTGAATGT	TGACGGGATG	2880

ERSATZBLATT



AACATAATAA	GCAATGAACG	CAGCAATAAA	CTCAACAGGA	GCAGGAAAGC	GAGGGTATCC	2940
CACAAAGTCC	AGOGTACCAT	AAACGCAAGC	CTCAACGCAG	CGACGAGCAC	GAGAGOGGTC	3000
AGTAGCAATC	CAAACITTTGT	TACTOGTCAG	AAAATCGAAA	TCATCTTOGG	TTAAATCCAA	3060
AAOCCGAGAA	GCCIGAAATGA	GAATTCGACC	TGAGGGGGGG	GCCCGGTACC	CAGCTTTTGT	3120
TCCCITTAGT	GAGGGTTAAT	TOOGAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT	GTTTCCTGTG	3180
TGAAATTGTT	ATCOGCTCAC	AATTCACAC	AACATAGGAG	COGGAAGCAT	AAAGTGTAAG	3240
GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGGTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGOGCTC	ACTGOCOGCT	3300
TTCCAGTOGG	GAAACCTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TOGGCCAAAC	CGGGGGGAGA	3360
GGCGGTTTGC	GTATTTGGCG	CTCTTCOGCT	TOCTOGCTCA	CTGACTOGCT	GOGCTOGGTC	3420
GTTOGGCTGC	GGGAGOGGCT	ATCAGCTCAC	TCAAAGGOGG	TAATAOGGTT	ATCCACAGAA	3480
TCAGGGGATA	AOCGAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAGGGCC	AGCAAAGGGC	CAGGAACCGT	3540
AAAAAGGCOG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTTCGGC	CCCCGTGAOG	GCATCAGAAA	3600
AATGACGCTC	CAAGTCAGAG	GTGGGAGAAC	COGACAGGAC	TATAAAGATA	CCAGGOGTTT	3660
CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	GTTTCGACCC	TGCOGCTTAC	OGGATACCTG	3720
TCOCCCTTTC	TCCCTTCOGG	AAGCGTGGCG	CTTTCTCAAT	GCTCAOGCTG	TAGGTATCTC	3780
AGTTTCGGTT	AGGTTCGTTG	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAACCCCC	CGTTTCAGCC	3840
GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAACTATOGT	CTTGAGTCCA	ACCCGTTAAG	ACAAGCTTCA	3900
TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT	AGGCGGTGCT	3960
ACAGGCTTGT	TGAAGTGGTG	GCCTAACCTAC	GGCTACACTA	GAAGGACAGT	ATTTGGTATC	4020
TCGGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCOGA	AAAAGAGTTG	GTAGCTCTTG	ATCCGGCAAA	4080
CAAAACACCG	CTGGTAGCGG	TGGTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	GCGCAGAAAA	4140
AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTAOGGGGT	CTGAOGCTCA	GTCGAACGAA	4200
AACTCAGGTT	AAGGGATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	CTAGATCCCT	4260
TTAAATTAAG	AATGAAGTTT	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	TTGGTCTGAC	4320
AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCAOCT	ATCTCAGOGA	TCGTCTTATT	TOGTTTATCC	4380
ATAGTTGCGT	GACTGCCCCG	CGTGTAGATA	ACTAOGATAC	GGGAGGGGCT	ACCATCTGGC	4440
CCCACTGCTG	CAATGATACC	GCGAGACCCA	CGCTCACOGG	CTCCAGATTT	ATCAGCAATA	4500
AACCCAGCCAG	COGGAAGGGC	CGAGGSCAGA	AGTGGTCTCG	CAACTTTTATC	CGCCTCCATC	4560
CAGTCTATTG	ATTGTTTGOG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA	TAGTTTGGCG	4620
AAOCTTCTTG	CCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTTTCACGCT	CGTGGTTTGG	TATGGCTTCA	4680
TTTCAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCGA	GTTACATGAT	CCCCCATGTT	GTCGAAAAAA	4740
GCGGTTAGCT	CCTTGGGTCC	TCCGATOGTT	GTCAGAAGTA	AGTTGGCOGC	AGTGTATATCA	4800
CTCATGCTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCOGT	AAGATGCTTT	4860
TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGOG	GCGACCGAGT	4920
TGCTCTTCCG	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	ACCGCGCCAC	ATAGCAGAAC	TTTAAAAGTG	4980
CTCATCTTTG	GAAAACGTTT	TTGGGGGCGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	GCTGTGAGA	5040
TCCAGTTTGA	TGTAACCCAC	TGTTGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	TACTTTTACC	5100
AGCGTTTCTG	GGTGAGCAAA	AACAGGAAGG	CAAAATGCOG	CAAAAAAGGG	AATAAGGGCG	5160
ACACGGAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC	CTTTTTCAAT	ATTATTTGAAG	CATTTTATCAG	5220
GGTTATTTGC	TCATGAGOGG	ATACATATTT	GAATGTATTT	AGAAAAATAA	ACAAATAGGG	5280
GTTCCGCGCA	CATTTCCCGG	AAAAGTGCCA	CCTG			5314

SEQ ID NO:5

ART DER SEQUENZ:Nucleotidsequenz (pML1)

SEQUENZLÄNGE:7641 Basenpaare

STRANGFORM:Einzelstrang

GACGCGGGC	AAGAGCAACT	CGGTGCGCGC	ATACACTATT	CTCAGAAATGA	CTTGGTTGAG	60
TACTCACCAG	TCACAGAAAA	GCATCTTACG	GATGGCATGA	CAGTAAGAGA	ATTATGCAGT	120
GCTGCCATAA	CCATGAGTGA	TAACACTGCG	GCCAACCTAC	TTCTGACAAC	GATOGGAGGA	180
COGAAGGAGC	TAACCGCTTT	TTTGACACAAC	ATGGGGGATC	ATGTAACCTG	CCTTGATCGT	240
TGGGAACCGG	AGCTGAATGA	AGCCATACCA	AAOGAOGAGC	GTGACACCAC	GATGCGTGCA	300
GCAATGGCAA	CAACGTTGCG	CAAACCTATTA	ACTGGOGAAC	TACTTACTCT	AGCTTCCCGG	360
CAACAATTAA	TAGACTGGAT	GGAGGCGGAT	AAAGTTGCAG	GACCACCTCT	GCGCTGGGCC	420
CTTCCGGCTG	GCTGGTTTAT	TGCTGATAAA	TCTGGAGCOG	GTGAGCGTGG	GTCTOGCGGT	480
ATCATTTGAG	CACITGGGGCC	AGATGGTAAAG	CCCTCCCGTA	TOGTAGTTAT	CTACACGACG	540
GGGAGTCAGG	CAACTATGGA	TGAAGGAAAT	AGACAGATCG	CTGAGATAGG	TGCCTCACTG	600
ATTAAAGCAT	GGTAACGTG	AGACCAAGTT	TACTCATATA	TACTTTAGAT	TGATTTAAAA	660
CTTCATTTTT	AATTTAAAAAG	GATCTAGGTG	AAGATCCTTT	TTGATAATCT	CATGACCAAA	720
ATCCCTTAAC	GTGAGTTTTT	GTTCACCTGA	GCGTCAGACC	CCTTAATAAG	ATGATCTTCT	780
TGAGATCGTT	TTGGTCTGCG	CGTAATCTCT	TGCTCTGAAA	AOGAAAAAAC	CGCCTTGCGG	840
GGCGGTTTTT	CGAAGGTTCT	CTGAGCTACC	AACCTCTTGA	ACOGAGGTAA	CTGGCTTGGA	900
GGAGCGCAGT	CACCAAAACT	TGTCTCTTCA	GTTTACGCTT	AACOGGCGCA	TGACTTCAAG	960
ACTAACTCCT	CTAAATCAAT	TACCAGTGGC	TGCTGCGAGT	GGTGCTTTTG	CATGCTCTTC	1020
CGGGTTGGAC	TCAAGACGAT	AGTTACOGGA	TAAGGCGCAG	CGGTGCGACT	GAAOGGGGGG	1080
TTGTGTGATA	CAGTCCAGCT	TGGAGCGAAC	TGCCTACCOG	GAACCTGAGT	TCAGGCGTGG	1140
AATGAGACAA	AOGGGGCCAT	AACAGCGGAA	TGACACCGGT	AAACOGAAAG	GCAGGAACAG	1200
GAGAGCGCAC	GAGGGAGCGG	CCAGGGGAAA	CGCCTGGTAT	CTTTATAGTC	CTGTGCGGTT	1260
TCGCCACCAC	TGATTTGAGC	GTCAGATTTT	GTCAGGCTTG	TCAGGGGGGC	GGAGCCTATG	1320
GAAAAACGGC	TTTGGCGCGG	CCCTCTCACT	TCCCTGTATA	GTATCTTCCCT	GGCATCTTCC	1380
AGGAAATCTC	CGCCCCGTTT	GTAAGCCATT	TCOGCTGCGC	GCAGTGAAC	GACCGAGCGT	1440
AGOGAGTCAG	TGAGCGAGGA	AGOGGAATAT	ATCCTGTATC	ACATATTCTG	CTGACGCACC	1500
GGTGCAGCCT	TTTTTCTCCT	GCCACATGAA	GCACCTCACT	GACACCTCA	TCAGTGCCAA	1560
CATAGTAAGC	CAGTATACAC	TCCGCTAGCG	CTGAGGTCCT	CCTGTGGAAG	AAGGTGTGTC	1620
TGACTCATAC	CAGGCCTGAA	TGCCCCATC	ATCCAGCCAG	AAAGTGAGGG	AGCCACCGTT	1680
GATGAGAGCT	TTGTTGTAGG	TGGACCAATT	GGTGATTTTG	AACCTTTGCT	TTGCCACGGA	1740
ACGGTCTGCG	TTGTGCGGAA	GATGCGTGAT	CTGATCCTTC	AACCTCAGCA	AAGTTGCGAT	1800
TATTTCAACAA	AGCCACGTTG	TGTCCTCAAAA	TCCTGATGT	TACATTGCAC	AAGATAAAAA	1860
TATATCATCA	TGAACAATAA	AACGTCTCTC	TTACATAAAC	AGTAATACAA	GGGGTGTAT	1920
GAGCCATATT	CAACGGGAAA	CGTCTTGCTC	GAGGCGCGCA	TTAAATTCCA	ACATGGATGC	1980
TGATTTATAT	GGGTATAAAT	GGGCTGCGGA	TAATGTGCGG	CAATCAGGTG	CGACAATCTA	2040
TOGATTGTAT	GGGAAGCCCG	ATGCGCCAGA	GTGTGTTCTG	AAACATGGCA	AAGGTAGCGT	2100
TGCCAATGAT	GTTACAGATG	AGATGGTCAG	ACTAAACTGG	CTGAOGGAAT	TTATGCCTCT	2160
TCCGACCATC	AAGCATTTTA	TCGGTACTCC	TGATGATGCA	TGGTTACTCA	CCACTGCGAT	2220
CCCGGGGAAA	ACAGCATTC	AGGTATTAGA	AGAATATCCT	GATTTCAGGTG	AAAATATTGT	2280
TGATGCGCTG	GCAGTGTTC	TGCGCGGTT	GATTGCGATT	CCTGTTTGTA	ATTGTCTTTT	2340
TAACAGCGAT	CGGTATTTTC	GTCGCGCTCA	GGCGCAATCA	CGAATGAATA	ACGGTTTGGT	2400
TGATGCGAGT	GATTTTGATG	ACGAGCGTAA	TGGCTGGCCT	GTGGAACAAG	TCTGGAAAGA	2460
AATGCATAAG	CTTTTGCCAT	TCTCACCGGA	TTACAGGTG	ACTCATGGTG	ATTCTCTACT	2520
TGATAACCTT	ATTTTGTAGC	AGGGGAAATT	AATAGGTTGT	ATTGATGTTG	GACGAGTCGG	2580
AATGCGAGAC	CGATACCAGG	ATCTTGCCAT	CCATATGGAAC	TGCGTGGTGG	AGTTTTCTCC	2640
TTTATTACAG	AAACGGCTTT	TTCAAAAATA	TGGTATTGAT	AATCCTGATA	TGAATAAATT	2700
GCAGTTTCAT	TTGATGCTCG	ATGAGTTTTT	CTAATCAGAA	TTGGTTAATT	GGTTGTAAAC	2760

ERSATZBLATT

CTGGCAGAGC ATTAAGCTGA CTGGAAGGGA OGGGGGCTTT GTTGAATAAA TOGAACTTTT 2820  
 GCTGAGTTGA AGGATCAGAT CACGCATCCT CCGACAAAG CAGACOGTTC OGTGGCAAAG 2880  
 CAAAAGTTCA AAATCACCAA CTGGTCCACC TACAACAAAG CTCTCATCAA OGTGGCTCC 2940  
 CTCACCTTCT GGTGGATGA TGGGGGGAAT CAGGCTGGT ATGAGTCAGC AACACCTTCT 3000  
 TCAAGAGCA GAACTCAGCG CTCAAAGATG CAGGGGTAAA AGCTAACCG ATCTTTACCG 3060  
 ACAAGGCATC OGGCAGTTCA ACAGATCGGG AAGGGCTGGA TTTGCTGAGG ATGAAGGTGG 3120  
 AGGAAGGTGA TGTATTCTG GTGAAGAAGC TCGACCGTCT TGGCGOGAC ACGCGOGACA 3180  
 TGATCCAACT GATAAAAGAG TTTGATGCTC AGGGTGTAGC GGTTCGGTTT ATTGAOGAG 3240  
 GGATCAGTAC OGAAGGTGAT ATGGGGCAAA TGGTGGTAC CATCTGTGG GCTGTGGCAC 3300  
 AGGCTGAAAG OGGAGGATC CAGTTGATG TAAOCCTC GTGCACCAA CTGATCTTCA 3360  
 GCATCTTTTA CTTTCACCAG OGTTTCTGGG TGAGCAAAA CAGGAAGGCA AAATGCGCA 3420  
 AAAAAAGAA TAAGGGGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTTCAATAT 3480  
 TATTGAGCA TTTATCAGGG TTATGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTGTA ATGTATTTAG 3540  
 AAAAAATTAAC AAATAGGGGT TCGGCGACA TTTCCCGAA AAGTGCCACC TGAOGTCTAA 3600  
 GAAACCTTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCAAGAG GOCCTTCTGT 3660  
 CTTCACTAT CTTTCCCTTT ATTTTGTCTG OGGTAAGTGG CATAAAAACC ATTCTTCATA 3720  
 ATTCAATCCA TTTACTATGT TATGTTCTGA GGGGAGTGA AATTCCCTTA ATTGAGTGA 3780  
 GATTCTGCT CAATTGTAT CAGCTATGG OGGACAGAA CACCTTGGG ATCAGCCAAA 3840  
 CGTCTCTCA GCGCACTGAC TAGCGATAAC TTTCCCGACA ACGGAACAAC TCTCATGCA 3900  
 TGGGATTAAT GGGTACTGTG GGTTTAGTGG TTGTAAAAAC ACCTGACCGC TATCCCTGAT 3960  
 CAGTTCTTG AAGGTAAACT CATCAACCCC AAGTCTGGCT ATGCAGAAAT CACCTGGCTC 4020  
 AACAGCTTG TCAGGGTCAA OGAGAATTAA CATTTCGTCA GGAAAGCTTG GCTTGGAGCC 4080  
 TGTTGAGG GTCATGGAAT TACCTTCAAC CTCAAGCCAG AATGCAGAAT CACTGGCTTT 4140  
 TTTGGTGG CTTACCCATC TCTCCGCATC ACCTTTGGTA AAGGTTCTAA GCTTAGGTGA 4200  
 GAACATCTT GCGTGAACAT GAGAAAAAAC AGGGTACTCA TACTCACTT TAAGTGAAGG 4260  
 CTGCATCTA ACGCTTCAT ACATCTGTGA GATTTCTCTG GOGATTGAAG GGCTAAATTC 4320  
 TTCAATCTA ACTTTGAGAA TTTTGTGAAG CAATGCGCG TTATAAGCAT TTAATGCATT 4380  
 GATGCTTA AATAAAGCAC CAAGCCCTGA CTGCCCCATC CCGATCTTGT CTGCGAGA 4440  
 TTCTCTGAT AAGCCAAGTT CATTTTCTTT TTTTTCATAA ATTGCTTTAA GGOAGGTC 4500  
 GTCTCTGCT TGCTCTGTG TTAATGGTTT CTTTTTGTG CTCATAOGTT AAATCTATCA 4560  
 COGCACTGA TAAATATCTA ACACCGTGG TGTGTACTAT TTTACCTCTG GGGGTGATAA 4620  
 TGGTTGATG TACTAAGGAG GTTGTATGGA ACAAGCATA ACCCTGAAAG ATTATGCAAT 4680  
 GOGCTTGG CAAACCAAGA CAGCTAAAGA TCCTCTAGCT AGAATTGAGG CTTCTGCGGT 4740  
 TTTGGTCTA ACGAAGATG ATTTGATTTT TCTGAAGAT AACAAAGTTT GGATTGCTAC 4800  
 TGACCTCTT CGTCTCTCTC GCTGCGTTGA GGTCTGCGTT TATGGTACGC TGGACTTTGT 4860  
 GGGATCTCT CGCTTCTCTG CTCTGTGTA GTTTATGCT GCGTCAATT CTTATTATGT 4920  
 TCATCTCTC AACATTCAAA OGGCTGTCT CATCATGGAA GGCGCTGAAT TTAAGGAAA 4980  
 CATTATCTT GGGTGGAGC GTCCGGTTAA AGCGCTGAA TTGTTGCGT TTAACCTTGG 5040  
 TGTACCTCA GGAAACACTG ACGTTCTTAC TGAAGCAGAA GAAACGTCG GTCAAAATTT 5100  
 ACGTCTTAA GGAGTATGT AATGTCTTAA GTTAAAAAAC GTTCTGGGCG TOGCGCTGGT 5160  
 CGTCTCTC CGTTGCGAGG TACTAAAGGC AAGGTAAAG GCGCTGTCT TTTGGTATGA 5220  
 GGTGGTCTA AATTTTAAAT GCAGGGGCTT CGGCCCTTA CTGAGGATA AATTATGTCT 5280  
 AATATCTAA CTGGGCGGA GGTATGCG CATGACCTTT CCGATCTTGG CTTCTCTGCT 5340  
 GGTCTATG GTGTCTTAT TACCATTTCA ACTACTCCG TTATGCGTGG CGACTCTCTC 5400  
 GAGATCTCG CGTTGGGCG TCTCGCTCTT TCTCATGTC GTGTTGGCCT TGCTATTGAC 5460  
 TCTACTCTAG ACATTTTAC TTTTATGTC CCTCATGTC ACGTTTATGG TGAACAGTGG 5520  
 ATTATCTCA TGAAGGATGG TGTTAATGCC ACTCTCTCT CGACTGTAA CACTACTGGT 5580  
 TATATCTCT ATGCGCTTTT TCTTGGCAG ATTAACCTG ATACCAATAA AATCCCTAAG 5640  
 CATTCTCTC AGGGTTATTT GAATATCTAT AACAACCTT TTAAAGCGCC GTGGATGCTT 5700  
 GACCTCTCG AGGCTAACCC TAATGAGAAT TCTCATGTTT GACAGCTTAT CATCGATAAG 5760  
 CTTCTCTG GTAGTTTATC ACAGTAAAT TGCTAAAGCA GTCAAGGCACC GTGTATGAAA 5820  
 TCTCTCTG CGCTCATGCT CATCTCGGC ACGTCAACC TGGATGCTGT AGGCATAGGC 5880  
 TTGCTCTC CGGTACTGCC GGGCTCTTG OGGGATATG TCCATTCTGA CAGCATOGCC 5940  
 AGTCTCTG GGTGCTGCT AGGCTATAT GGTGTATGC AATTCTATG CGCACCCTTT 6000  
 CTGCTCTC TGTGCGACG CTTTGGGCG OGGCGAGTC TGCTGCTCT GCTACTTGA 6060  
 GCGCTCTC ACTACGGAT CATGGGACC ACACCGTCC TGTGGATCG GATCAGCAGG 6120  
 TGGATCTC ACTGGATTCC AAAGTTCTCA ATGCTGCTTG CTGTTCTTGA ATGGGGGTC 6180

GTTGACGACG	ACATGGCTCG	ATTGGGCGGA	CAAGTTCGCTG	CGATTCTCAC	CAATAAAAAA	6240
CGCCCGGCGG	CAACCGAGCG	TTCCTGAACAA	ATCCAGATGG	AGTTCTGAGG	TCATTACTGG	6300
ATCGCCGGAT	CTGAATTGCT	ATGTTTAGTG	AGTTGTATCT	ATTTATTTTT	CAATAAATAC	6360
AATTTGGTTAT	GTGTTTTGGG	GGGATGTGTG	AGGCAAAGAA	AACCGGGCGC	TEAGGCGCGA	6420
AGCATAAAGT	GTAAAGCCTG	GGGTGCTTAA	TGAGTGAGCT	AACTCACATT	AATTGCGTTG	6480
CGCTCACTGC	CGCTTTTCCA	GTCGGGAAAC	CTGTGTGTGC	AGCTGCATTA	ATGAATGGC	6540
CAACGCGCGG	GGAGAGGCGG	TTTGGGTATT	GGGCGCCAGG	GTGGTTTTTC	TTTTTACCAG	6600
TGAGACGGGC	AACAGCTGAT	TGCCCTTCAC	CGCTTGGCCC	TGAGAGAGTT	GCAGCAAGCG	6660
GTCACGCTTG	GTTTGCCCCA	GCAGGCGAAA	ATCCTGTTTG	ATGGTGGTTG	AOGGOGGGAT	6720
ATAACATGAG	CTGTCTTCGG	TATGTGTGTA	TCCCACTACC	GAGATATCG	CACCAACGCG	6780
CAGCCCGGAC	TGGTAAATGG	CGCGCATTCG	GCCCAGOGCC	ATCTGATGTT	TGGCAACCAG	6840
CATGCGAGTG	GGAAAGATGC	CTTCATTTCAG	CATTTTGCATG	GTTTGTGTAA	AACCGGACAT	6900
GGCACTCCAG	TGGCTTTCCC	GTTCGGCTAT	CGGCTGAATT	TGATTGOGAG	TGAGATATTT	6960
ATGCCAGCCA	GCCAGACGCA	GACGCGCGGA	GACAGAACTT	AATGGGCGCG	CTAACAGCGC	7020
GATTTCCTTG	TGACCCAATG	CGACCATATG	CTCCAAGCCC	AGTGGGTGAC	CGTCTTCATG	7080
GGAGAAAATA	ATACTGTGTA	TGGGTGTCTG	GTCAGAGACA	TCAAGAAATA	ACGCGGGAAC	7140
ATTAGTGCAG	GCAGCTTCCA	CAGCAATGGC	ATCCTGGTCA	TCCAGCGGAT	AGTTAATGAT	7200
CAGCCCACTG	ACGCGTTTGG	CGAGAAGATT	GTGCACCGCC	GCTTTACAGG	CTTGGACGCC	7260
GCTTGGTTCT	ACCATGACAA	CCACCAAGCT	GGCACCCAGT	TGATGGGCGC	GAGATTTAAT	7320
CGCGCGGACA	ATTTGCGACG	GCGCGTGCAG	GGCCAGACTG	GAGGTGGCAA	CGCCAATCAG	7380
CAACGACGTG	TTGCCCCGCA	GTGTGTGTGC	CACGCGGTTC	GGAAATGTAAT	TCAGCTCCGC	7440
CATGCGCGCT	TCCACTTTTT	CCCGGTTTTT	CGCAGAAACG	TGGCTGGCCT	GGTTCACCAC	7500
GCGGGAAAG	GTCTGATAAG	AGACACCGGC	ATACTCTGCG	ACATGTTATA	ACGTTACTGG	7560
TTTCACATTC	ACCACCTGTA	ATTGACTCTC	TTCGGGCGCT	ATCATGCCAT	ACCGCGAAAG	7620
GTTTTGGCGC	ATTGATGGT	G				7641

SEQ ID: 6

ART DER SEQUENZ: Nucleotidsequenz  
SEQUENZLÄNGE: 3681 Basenpaare

(pKSEL5)

STRANGFORM: Einzelstrang

AAATTGTAAA	CGTTAATATT	TTGTTAAAAT	TOGOGTTAAA	TTTTTGTTAA	ATCAGCTCAT	60
TTTTTAAACA	ATAGGCGGAA	ATCGGCAAAA	TCCCTTATAA	ATCAAAAAGAA	TAGACCGAGA	120
TAGGGTTGAG	TGTTGTTCCA	GTTTGAACA	AGAGTCCACT	ATTAAAGAAC	GTGGACTCCA	180
ACGTCTAGG	GCGAAAACC	GTCTATCAGG	GCGATGGCCC	ACTAOGTGAA	CCATCACCTT	240
AATCAATTT	TTTGGGGTGG	AGGTGCOGTA	AAGCACTAAA	TGGGAACCTT	AAAGGGAGCC	300
CCCGTTGAG	AGCTTGAAGG	GGAAAGCOGG	CGAAGCTGGC	GAGAAAGGAA	GGGAAGAAAG	360
CGAAAGAGC	GGGOGCTAGG	GCGCTGGCAA	GTGTAGOGGT	CACGCTGGCC	GTAACCCACCA	420
CACCGCTGC	GCTTAATGCG	COGCTACAGG	GCGGTCCCA	TTCGCCATTC	AGGCTACGCA	480
ACTGTTTGA	AGGGCGATCG	GTGGGGGCTT	CTTGGCTATT	ACGCCAGCTG	GCGAAGGGGG	540
GATGTCTGTC	AAGGCGATTG	AGTTGGGTAA	CGCCAGGGTT	TTCCAGTICA	CGAOGTTGTA	600
AAACGACCTC	CAGTGAATTG	TAATAOGACT	CACATATAGG	CGAATTGGAG	CTCCACCGCG	660
GTGGGCTGG	CTCTAGTATG	GTGCACTCTC	AGTACAATCT	GCTCTGATGC	CGCATAGTTA	720
AGCGGCTGA	TACACTCOGC	TATOGCTAOG	TGACTGGGTC	ATGGCTGGCC	CCCGACACCC	780
GCGAAGTAC	GCTGAAGGCG	CCTGAAGGCG	TTGTCTGGTC	CCGGCATCOG	CTTACAGACA	840
AGCTGCTGC	GTCTCGGGGA	GCTGCAATGG	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG	900
OGCTGCTGC	TAAGGTGGGA	TGCTTTGTGA	GCAATTGGTC	CCTTAAGTAA	GCAATTGCTG	960
TAACTGCTC	ACTGTGCGGA	TCACCGCTTC	CAGTAGOGAC	AGAAGCAATT	GATTGGTTAAA	1020
TTTTGCTGA	AAGATOGCGA	GGAAGATCAA	TACATAAAGA	GTTGAACCTC	TTTGTGTGCT	1080
TOGCTGCTG	TAATCCTCAT	GTTTGAATGG	CCCTAGACGA	TCCGGCCAAG	CTTGCATGCC	1140
TGCGGCTGA	CTCTAGAGGA	TCCCGGACCG	TGAATGTTGA	CGGGATGAAC	ATAATAAGCA	1200
TCAGGCTGC	CCATGATGAG	ACAGGCGGTT	TGAATGTTGA	CGGGATGAAC	ATAATAAGCA	1260
ATGACGCTG	CAATAAATCT	AACAGGAGCA	GGAAAGOGAG	GGTATCCAC	AAAGTCCAGC	1320
GTACGCTGA	CGCAAGCCTC	AAOGCAGCGA	CGAGCAOGAG	AGCGGTGAGT	AGCAATCCAA	1380
ACTGTTGCT	TOGTGAGAAA	ATOGAAATCA	TCCTCGGTTA	AATCCAAAAC	GGCAGAAGCG	1440
TGCTGCTGA	TTGACCTCG	AGGGGGGGCC	CGGTACCCAG	CTTTTGTGTC	CTTTAGTGAG	1500
GGTGTGCTC	GAGCTTGGCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	1560
CGGCTGCTC	TCACACCAAC	ATAGGAGCGG	GAAGCATAAA	GTGTAAGGCC	TGGGGTGCCT	1620
AACTGCTAG	GTAATCTACA	TTAATTGGGT	TGCGCTCACT	GCCCGCTTTC	CAGTOGGGAA	1680
AGCTGCTGC	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAAOGGCG	GGGGAGAGGC	GGTTTGGGTA	1740
TTCTGCTGC	TTCCGCTTCC	TOGCTCACTG	ACTOGCTGGG	CTGGTGGTTT	CGGCTGGGGC	1800
GAGAGCTGC	AGCTCACICA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	1860
CAGAGCTGA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACGGTAAA	AAGGCCGGGT	1920
TGCTGCTGC	TTTCCATAGG	CTGGGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAT	CGAOGCTCAA	1980
GGTGTGCTG	GCGAAACCGG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGGGTTCCCC	OCTGGAAGCT	2040
CCGCTGCTG	CTCTCCTGTT	CGACCCCTGC	CGCTTACCGG	ATAOCTGTCC	GCTTTTCTCC	2100
CGCTGCTGC	CGTGGGCGTT	TCCTCAATGCT	CAOGCTGTAG	GTATCTCAGT	TOGGTGTAGG	2160
TGCTGCTGC	CAAGCTGGGC	TGTTGTGACG	AACCCCGCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGGGCGT	2220
TAATGCTGC	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	2280
CGCTGCTGC	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	2340
AGCTGCTGC	TAACTACGGC	TACACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	2400
AGCTGCTGC	CTTOGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGTATC	CGGCAACAAA	ACCACCGCTG	2460
GTAGCTGCT	TTTTTTTTTCT	TGCAAGCAGC	AGATTACOGG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	2520
AAGCTGCTC	GATCTTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAAOGAAAAC	TCACGTTAAG	2580
GGAAGCTGC	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCCTTCACTA	GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	2640
GAAAGCTGC	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	2700

TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGOGATCT	GTCTATTTCG	TTCATCCATA	GTTCCTGAC	2760
TGCCCCGTGT	GTAGATAACT	ACGATAOCCG	AGGGCTTACC	ATCTGCCCCC	AGTGCIGCAA	2820
TGATACOGOG	AGACCCAOCG	TCACOGGCTC	CAGATTITATC	AGCAATTAAC	CAGCCAGCCG	2880
GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTATATCCG	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	2940
GTTCGCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCCG	CAGTTAATAG	TTTGGCCAAC	GTGTGTGCCA	3000
TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	3060
CCCAACGATC	AAGGOCAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	AAAAAAGOG	GTTAGCTCCT	3120
TCGGTCCCTC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCACT	GTTATCACTC	ATGCTTATGG	3180
CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTTCATG	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	3240
AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCGG	3300
CGTCAATAAG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTTGGAA	3360
AACGTTCTTC	GGGGOGAAAA	CTCTCAAGGA	TCCTACCGCT	GTTCAGATCC	AGTTGATGT	3420
AACCCACTCG	TGCAOCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTCCTGGGT	3480
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCOGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGGACAC	CGGAAATGTT	3540
GAATACTCAT	ACTCTTCCCT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	TATTGTCTCA	3600
TGAGCGGATA	CATATTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	3660
TTCCCCGAAA	AGTGCCACTT	G				3681

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Trägergebundenes rekombinantes Protein erhältlich durch Expression eines Fusionsprotein-Gens in gramnegativen Bakterien, welches für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie für das rekombinante Protein kodiert und eines Gens, das für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen, für ein lytisch wirkendes Toxinreleasegen oder für lytisch wirkende Teilsequenzen davon kodiert, und Gewinnung des trägergebundenen rekombinanten Proteins aus der Kulturbrühe.
2. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne eine  $\alpha$ -helicale Struktur besitzt und aus 14 bis 20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2 bis 30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein kann.
3. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 oder 2 dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein mindestens eine weitere Proteindomäne enthält, die aus 10 bis 16 Aminosäuren besteht und eine  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstruktur besitzt.
4. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 3 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomäne, die Aminosäuren 1 bis 54 aus dem Protein E des Phagen  $\Phi$ X174, die Aminosäuren 21 bis 75 aus dem Protein L des Phagen MS2 und/oder eine Aminosäuresequenz, die aus diesen Sequenzen durch Aminosäureaustausch erhältlich ist und eine analoge Protein-Sekundärstruktur besitzt, enthält.

5. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß die Proteindomänen und das rekombinante Protein durch eine hydrophile Aminosäuresequenz mit 2 bis 100 Aminosäuren und ungeordneter Sekundärstruktur verbunden sind.
6. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein eine antigene Struktur aufweist.
7. Trägergebundenes rekombinantes Protein nach den Ansprüchen 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß an das rekombinante Protein ein nicht kovalent bindender Bindungspartner für dieses Protein, an dem gegebenenfalls noch weitere Substanzen kovalent oder nicht kovalent gebunden sind, gebunden ist.
8. Trägergebundenes Protein nach Anspruch 7 dadurch gekennzeichnet, daß das rekombinante Protein Streptavidin oder Avidin ist.
9. Trägergebundenes Protein nach den Ansprüchen 7 und 8 dadurch gekennzeichnet, daß der nicht kovalente Bindungspartner ein biotinyliertes Antigen ist.
10. Rekombinante DNA, die eine erste DNA-Sequenz (DNA-Targetsequenz), welche für mindestens eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne codiert, eine zweite DNA-Sequenz (DNA-Proteinsequenz), die für ein rekombinantes Protein kodiert, sowie eine unter



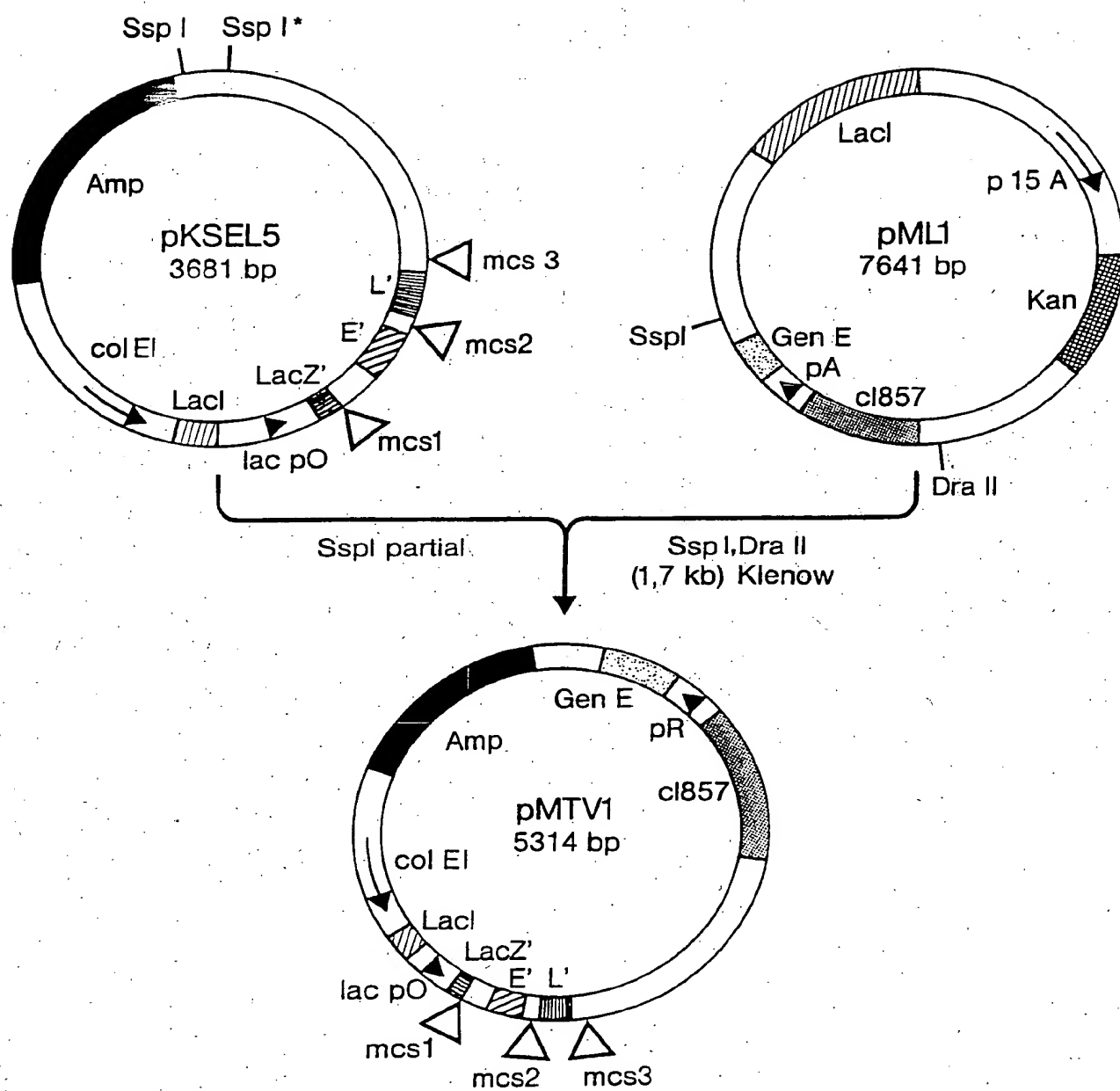
davon getrennter Kontrolle stehenden DNA-Sequenz (DNA-Lyseggen), die für ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-release-Gen oder für deren lytisch wirkenden Teile kodiert, enthält.

11. Verfahren zur Herstellung eines trägergebundenen rekombinanten Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß in gramnegativen Bakterien ein Fusionsprotein, welches mindestens eine hydrophobe nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne sowie ein rekombinantes Protein enthält und ein lytisch wirkendes Membranprotein aus Bakteriophagen oder eines lytisch wirkenden Toxinrelease Gens oder lytisch wirkender Teilsequenzen davon exprimiert werden und das trägergebundene rekombinante Protein aus der Kulturbrühe gewonnen wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein weiteres Gen eines rekombinanten Proteins exprimiert wird.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 11 oder 12 dadurch gekennzeichnet, daß bei der Kultivierung die Aktivität des lytischen Membranproteins inhibiert oder die Expression des lytisch wirkenden Membranproteins oder Toxingens reprimiert wird und zu einem gewünschten Zeitpunkt die Inhibierung oder Repression aufgehoben wird.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 11 - 13 dadurch gekennzeichnet, daß das trägergebundene Protein mit einem gegebenenfalls derivatisierten Bindungspartner für das trägergebundene Protein inkubiert und das entstandene trägergebundene Konjugat isoliert wird.

15. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern dadurch gekennzeichnet, daß ein Säugetier mit einem trägergebundenen Protein nach den Ansprüchen 1 bis 9 immunisiert wird und die Antikörper aus dem Serum oder der Milz gewonnen werden.
16. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern nach Anspruch 15 dadurch gekennzeichnet, daß B-Lymphozyten der immunisierten Tiere in Gegenwart von transfomierenden Agenzien, mit einer geeigneten Zelllinie fusioniert werden, die gewünschte Antikörper produzierende Zelllinie kloniert und kultiviert wird und aus den Zellen oder dem Kulturüberstand die Antikörper gewonnen werden.
17. Verwendung der trägergebundenen Proteine nach den Ansprüchen 1 - 9 zur Herstellung von Vakzinen.
18. Vakzin, erhältlich nach den Ansprüchen 1 - 9.

1/2

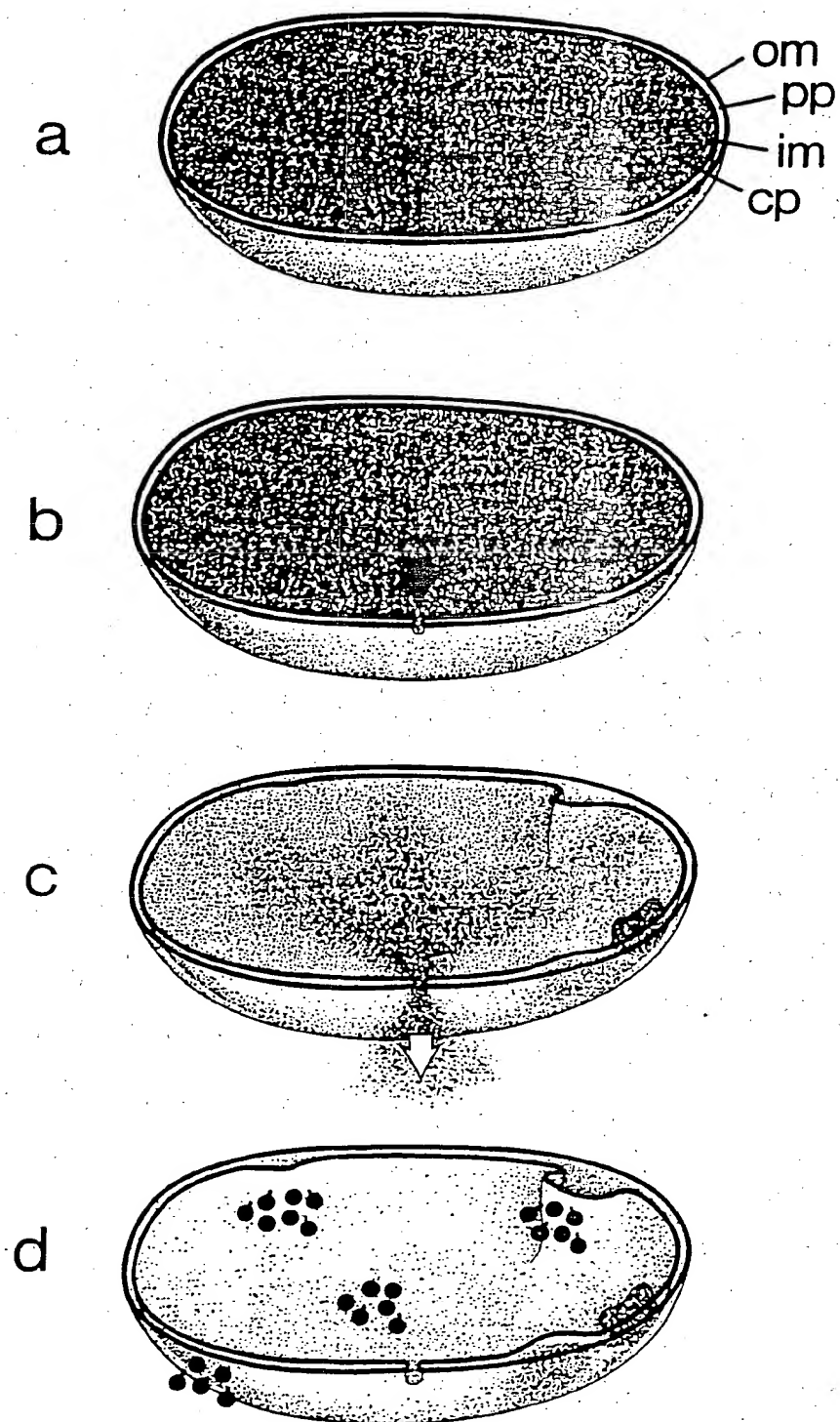
Fig. 1



ERSATZBLATT

2/2

Fig. 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 91/00308

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Int. Cl.<sup>5</sup> C 12 N 15/62, A 61 K 39/00</div>														
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: right; font-size: 0.8em;">Minimum Documentation Searched <sup>7</sup></div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 25%; border: none;">Classification System</td> <td style="border: none;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="border: none; text-align: center; font-size: 1.2em;">Int. Cl.<sup>5</sup></td> <td style="border: none; text-align: center;">C 12 N, A 61 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; font-size: 0.8em;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup></div>			Classification System	Classification Symbols	Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 N, A 61 K								
Classification System	Classification Symbols													
Int. Cl. <sup>5</sup>	C 12 N, A 61 K													
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; font-size: 0.8em;">Category <sup>9</sup></th> <th style="width: 70%; font-size: 0.8em;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; font-size: 0.8em;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">X</td> <td>EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 November 1988 see the whole document (cited in the application)</td> <td style="vertical-align: top;">1, 4, 10, 11, 13</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY.LTD) 5 November 1987 see claims 1-3, 17-21, 37, 38</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">P, X</td> <td>Res. Microbiol., vol. 141, No. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", pages 1005-1007</td> <td style="vertical-align: top;">1-6, 10-13, 15-18</td> </tr> </tbody> </table>			Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 November 1988 see the whole document (cited in the application)	1, 4, 10, 11, 13	A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY.LTD) 5 November 1987 see claims 1-3, 17-21, 37, 38		P, X	Res. Microbiol., vol. 141, No. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", pages 1005-1007	1-6, 10-13, 15-18
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>												
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17 November 1988 see the whole document (cited in the application)	1, 4, 10, 11, 13												
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY.LTD) 5 November 1987 see claims 1-3, 17-21, 37, 38													
P, X	Res. Microbiol., vol. 141, No. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", pages 1005-1007	1-6, 10-13, 15-18												
<div style="display: flex; justify-content: space-between; font-size: 0.8em;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of the Actual Completion of the International Search  <div style="text-align: center;">13 May 1991 (13.05.91)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Date of Mailing of this International Search Report  <div style="text-align: center;">28 June 1991 (28.06.91)</div> </td> </tr> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           International Searching Authority  <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           Signature of Authorized Officer         </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">13 May 1991 (13.05.91)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">28 June 1991 (28.06.91)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer								
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center;">13 May 1991 (13.05.91)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center;">28 June 1991 (28.06.91)</div>													
International Searching Authority <div style="text-align: center;">EUROPEAN PATENT OFFICE</div>	Signature of Authorized Officer													

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9100308  
SA 44507

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 25/06/91  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A- 3715840	01-12-88
		JP-A- 63287489	24-11-88
WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A- 0267204	18-05-88
		JP-T- 1500117	19-01-89
		AU-A- 7351087	24-11-87
		ZA-A- 8702795	07-10-87

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 91/00308**

<b>I. KLASSE</b> <b>ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC <b>Int.Cl.<sup>5</sup> C 12 N 15/62, A 61 K 39/00</b>														
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup></div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssystem</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><b>Int.Cl.<sup>5</sup></b></td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"><b>C 12 N, A 61 K</b></td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px; font-size: small;">Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen<sup>8</sup></div>			Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	<b>Int.Cl.<sup>5</sup></b>	<b>C 12 N, A 61 K</b>								
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole													
<b>Int.Cl.<sup>5</sup></b>	<b>C 12 N, A 61 K</b>													
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <th style="width: 10%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Art*</th> <th style="width: 70%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Kennzeichnung der Veröffentlichung<sup>11</sup>, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile<sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Betr. Anspruch Nr. 13</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1, 4, 10, 11, 13</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --</td> <td style="border: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P, X</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007  -----</td> <td style="border: 1px solid black; text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-6, 10-13, 15-18</td> </tr> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. 13	X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1, 4, 10, 11, 13	A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --		P, X	Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007  -----	1-6, 10-13, 15-18
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. 13												
X	EP, A, 0291021 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 17. November 1988 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1, 4, 10, 11, 13												
A	WO, A, 8706590 (BIOENTERPRISES PTY. LTD) 5. November 1987 siehe Ansprüche 1-3, 17-21, 37, 38 --													
P, X	Res. Microbiol., Band 141, Nr. 7-8, 1990, Institut Pasteur/Elsevier, (Paris, FR), M. Szostak et al.: "Recombinant bacterial ghosts as vaccines", Seiten 1005-1007  -----	1-6, 10-13, 15-18												
<div style="font-size: x-small;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div>														
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">           Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  <b>13. Mai 1991</b> </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;">           Absendedatum des internationalen Recherchenberichts  <div style="text-align: right; font-weight: bold;">28 JUN 1991</div> </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">           Internationale Rechercheneinrichtung  <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div> </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">           Unterschrift des bevollmächtigten Repräsentanten  <div style="text-align: right;">   <b>MISS T. TAZELAAR</b> </div> </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>13. Mai 1991</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-weight: bold;">28 JUN 1991</div>	Internationale Rechercheneinrichtung <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Repräsentanten <div style="text-align: right;">   <b>MISS T. TAZELAAR</b> </div>								
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche <b>13. Mai 1991</b>	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: right; font-weight: bold;">28 JUN 1991</div>													
Internationale Rechercheneinrichtung <div style="text-align: center;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des bevollmächtigten Repräsentanten <div style="text-align: right;">   <b>MISS T. TAZELAAR</b> </div>													

# ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9100308

SA 44507

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 25/06/91  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0291021	17-11-88	DE-A- 3715840	01-12-88
		JP-A- 63287489	24-11-88
WO-A- 8706590	05-11-87	EP-A- 0267204	18-05-88
		JP-T- 1500117	19-01-89
		AU-A- 7351087	24-11-87
		ZA-A- 8702795	07-10-87

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82